Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. H.- J. Gerth

Untersuchungen zur Konzentrierung, Reinigung und Charakterisierung des infektiösen Hepatitis A-Virus

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
URSULA CLAUDIA HEINRICY
aus Ottendorf

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0095

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Tübingen
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. med. K. Botzenhart
Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie
der Viruskrankheiten
Abteilungsleiter: Professor Dr. med. H.- J. Gerth

Untersuchungen zur Konzentrierung, Reinigung und Charakterisierung des infektiösen Hepatitis A-Virus

INAUGURAL—DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
URSULA CLAUDIA HEINRICY
aus Ottendorf

1985

Dekan:	Professor Dr. med. M. Siess
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. rer. nat. B. Flehmig
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. H. Malchow

---

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material	6
2.1	Chemikalien	6
2.2	Lösungen, Medien und Seren	6
2.3	Zellen	9
2.4	Virusstämme	10
3.	Methoden	11
3.1	Methoden zur Konzentrierung des HAV	11
3.1.1	Ultrazentrifugation	11
3.1.2	Ammoniumsulfatfällung	11
3.2	Methoden zur Reinigung des konzentrierten HAV	12
3.2.1	Isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation	12
3.2.2	Zonendichtegradienten-Zentrifugation	12
3.2.3	Immunpräzipitation	13
3.3	Isolierung von IgG aus Serum	13
3.4	Proteinbestimmung nach Bradford	13
3.5	Antigennachweis mit Radioimmunoassay	14
3.6	Herstellung von Zellkulturen	15
3.7	Methode zum Nachweis der Infektiosität	15
3.8	Markierung des HAV	15
3.9	Bestimmung der Sedimentationskonstanten	16
3.10	Methoden zur Darstellung der Virusproteine	17
3.10.1	Polyacrylamidgelelektrophorese	17
3.10.1.1	Disk-Elektrophorese	18
3.10.1.2	Gradientengel	18
3.10.2	Färbemethoden	19
3.10.3	Autoradiographie	20
3.11	Bestimmung des Molekulargewichts	20

		Seite
4.	Versuche und Ergebnisse	22
4.1	Untersuchungen im Verlauf der Konzentrierung des Hepatitis A-Virus durch Ultrazentrifugationen	22
4.1.1	Bestimmung der Antigenität im Verlauf der Konzentrierung	22
4.1.2	Reinigungsverfahren	23
4.1.2.1	Caesiumchlorid-Gradient	23
4.1.2.2	Saccharosegradient	25
4.1.3	Darstellung der Proteine während des Konzentrierungs- und Reinigungsverlaufes durch Gelelektrophorese	27
4.1.4	Infektiositätsnachweis	30
4.1.4.1	Infektiositätsnachweis der Fraktionen des CsCl-Gradienten	30
4.1.4.2	Infektiositätsnachweis der Fraktionen des Saccharose-Gradienten	30
4.2	Untersuchungen im Verlauf der Konzentrierung des Hepatitis A-Virus durch Ammoniumsulfatfällung	33
4.2.1	Bestimmung der Antigenität nach Ammoniumsulfatfällung und nachfolgenden Ultrazentrifugationen	33
4.2.2	Reinigungsverfahren	36
4.2.2.1	Saccharosegradient	36
4.2.2.2	Caesiumchlorid-Gradient	38
4.2.3	Darstellung des gereinigten Antigens	41
4.2.4	Nachweis der Infektiosität der Fraktionen des CsCl-Gradienten	41
4.3	Darstellung von Bandenmuster eines Proteinstandards in Gelen unterschiedlicher Konzentration	44
4.4	Bestimmung der Nachweisgrenze von Proteinen im Polyacrylamidgel mit verschiedenen Färbemethoden	45

		Seite
4.5	Immunpräzipitation der Antigenpeak-Fraktionen	47
4.5.1	Darstellung der Immunpräzipitate	48
4.6	Darstellung der Proteine des radioaktiv markierten Antigens	49
4.6.1	Ausmessung des Gels im Gamma-Counter und Bestimmung der Molekulargewichte	51
4.6.2	Autoradiographie	53
4.6.3	Bestimmung der Molekulargewichte	56
4.7	Bestimmung der Sedimentationskonstanten des infektiösen Hepatitis A-Virus	57
5.	Diskussion	62
6.	Zusammenfassung	71
7.	Literaturverzeichnis	73

Verwendete Abkürzungen:

HAV	Hepatitis A-Virus
Frhk-4/R	Fötale Rhesus Affennierenzellen
HFS	Menschliche Embryo-Lungen-Fibroblasten
HAV/Frhk-4/R	HAV, das auf Frhk-4/R Zellen vermehrt wurde
HAV/HFS	HAV, das auf HFS Zellen vermehrt wurde
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
$TCID_{50}$	50%ige Tissue Culture Infectious Dose
RIA	Radioimmunoassay
TEMED	N,N,N',-Tetramethylenethylendiamin
SDS	Dodecylsulfat, Na-Salz
FKS	Fötales Kälberserum
TMV	Tabak Mosaik-Virus
HC	Haemocyanin
CsCl	Caesiumchlorid
VP	Virusprotein
MEM	Minimal Essential Medium

1. Einleitung

Über viele Jahrhunderte bis in die Nachkriegsjahre des zweiten Weltkriegs zeichnete sich die Epidemiologie der Hepatitis A-Virusinfektionen dadurch aus, daß überall dort, wo Menschen unter mangelhaften hygienischen Bedingungen zusammenlebten, gehäuft Hepatitis A-Infektionen auftraten. Inzwischen hat sich die Epidemiologie der Hepatitis A durch den hohen Hygienestandard in den industrialisierten Ländern verändert. Die Erkrankungshäufigkeit an Hepatitis A, die vor allem fäkal-oral übertragen wird, ging in der Bundesrepublik Deutschland rapide zurück (ca. 5 Infektionen pro 1000 Personen und Jahr) (1, 22). Allerdings stieg dadurch die Zahl der Personen, bei denen keine Immunität gegen Hepatitis A besteht. Während in Entwicklungsländern und in Ländern mit niedrigem hygienischen Standard die Durchseuchungsrate bei Erwachsenen 90-100% beträgt, haben in der Bundesrepublik Deutschland nur 36% der 20-30jährigen Personen Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus (34). Diese Bevölkerungsgruppe ist daher durch Reisen in südliche Länder mit hohem Hepatitis A-Risiko besonders gefährdet, an Hepatitis A zu erkranken.

Die Bemühungen, das infektiöse Agens zu isolieren und zu charakterisieren, sind dadurch erschwert worden, daß das Virus bereits 1-2 Wochen vor der Manifestation klinischer Symptome ausgeschieden wird und bei Krankheitsausbruch nur noch in geringen und abnehmenden Konzentrationen nachweisbar ist (19, 10). Feinstone und Mitarbeiter gelang es 1973 (12), das ätiologische Agens in Form von 27nm Partikel durch Immunelektronenmikroskopie sichtbar zu machen. Das dazu notwendige Virusmaterial gewann er aus Stuhl von Personen, die sich freiwillig mit dem MS-1-Stamm des Hepatitis A-Virus (HAV) infizieren ließen.

Der immunelektronenmikroskopische Nachweis des Antigens konnte schließlich durch einfachere, praktikablere und empfindlichere Methoden erweitert werden. Verschiedene serologische Testsysteme zum Nachweis des Antigens und seiner Antikörper wurden von Hollinger und Mitarbeiter 1975 (27), Provost und Mitarbeiter 1975 (38), Miller und Mitarbeiter 1975 (33), Purcell und Mitarbeiter 1976 (41) und Flehmig und Mitarbeiter 1978 (20, 21) beschrieben. Dadurch wurde die Routinediagnostik der Hepatitis A-Infektionen erst möglich (15).
Bevor das HAV mit serologischen Methoden in vitro identifiziert werden konnte, wurde der Nachweis durch Demonstration der Infektiosität in Tierversuchen geführt. Diese in vivo Tests wurden zuerst von Deinhard und Mitarbeiter durchgeführt, die erfolgreich menschliche Hepatitis A-Viren auf verschiedene Spezies südamerikanischer Marmoset Affen übertrugen (9). Die Schimpansen, die Bradley und Mitarbeiter (3) und die Marmoset Affen (Sanguinus mystax), die Provost und Mitarbeiter (40) zur Vermehrung des HAV verwendeten, erwiesen sich als die Spezies mit der höchsten Empfänglichkeit gegenüber menschlichem HAV. Versuche, das Virus auf andere Tiere zu übertragen, schlugen fehl.
Das besondere Interesse galt nun der Antigenvermehrung in vitro, damit der begrenzende Faktor der Tierbeschaffung und Tierhaltung ausgeschaltet werden konnte. Die erste Publikation, die die erfolgreiche Virusvermehrung in fötalen Rhesus Affennierenzellen (Frhk-6) beschrieb, erschien 1979 von Provost und Hilleman (37). Der Nachteil der Frhk-6 Zellen bestand jedoch darin, daß sie sich nur bis maximal 12 Passagen vermehren ließen. Die Alexander-Zellinie aus Leberzellen, die Frösner und Mitarbeiter 1979 (24) zur HAV Gewinnung benutzten, produzierte zusätzlich ein Antigen des Hepatitis B-Virus. Flehmig gelang 1980 (16) die Vermehrung des HAV in einer Frhk-4 Zellinie, die sich unbegrenzt

passagieren ließ. Er konnte zudem das Antigen im Zellüberstand nachweisen, was bis dahin nicht gelungen war. Das HAV wurde dann an die schnell wachsende Frhk-4/R Zellinie adaptiert (17).
Im Hinblick auf die Impfstoffentwicklung wurde die Virusproduktion in menschlichen Zellen angestrebt. Nach der Adaptation des Virus an menschliche embryonale Nierenzellen, konnte es in einem menschlichen embryonalen Fibroblasten Zellstamm aus Lungengewebe repliziert werden (18). Für die ersten Impfversuche wurden Marmoset Affen verwendet. Hierfür wurde an Frhk-6 Zellen adaptiertes HAV benutzt, welches durch mehrmalige Passagen auf menschlichen Lungenfibroblasten, an dieselben adaptiert wurde (39).

Seit die HAV Partikel elektronenoptisch sichtbar gemacht und das Antigen in verschiedenen Testsystemen von den oben genannten Autoren nachgewiesen werden konnte, wurden die Bemühungen zur Aufklärung des Aufbaus und der Eigenschaften des infektiösen Agens vorangetrieben. Elektronenmikroskopisch stellten sich die Hepatitis A-Viren, die aus Stuhlproben, Leberextrakten, Serum oder Zellkulturen isoliert wurden, als hüllenlose, kubisch symmetrische Partikel mit einem mittleren Durchmesser von 27nm dar (46).
Trotz unterschiedlicher Herkunft des HAV sind sich die Autoren weitgehend einig, daß die Dichten der Hepatitis A-Partikel in CsCl im Bereich zwischen 1,30 - 1,34g/cm^3, sowie zwischen 1,38 - 1,44g/cm^3 liegen (3, 13, 17, 19, 21, 27, 40, 43, 50). Schulman und Mitarbeiter (43) identifizierten im Cytoplasma einer infizierten Schimpansenleber bei 1,34g/cm^3 volle Partikel und bei 1,29g/cm^3 leere Partikel. Dagegen konnte Flehmig keinen derartigen Unterschied zwischen den verschieden dichten Partikel feststellen (21).
Die aus Stuhl isolierten HA-Viren, deren Hauptbande in CsCl eine Dichte von 1,34g/cm^3 aufwiesen, sedimentierten bei 160s (5, 50). Übereinstimmend mit dem höchsten

Infektiositätstiter waren die nukleinsäurehaltigen Partikel fast ausschließlich in der 160s Antigenpeak-Fraktion vertreten (45). Die 1,41g/cm^3 dichten Partikel waren ziemlich labil und zerfielen in 160s, 90 - 100s und 50s Komponenten (46). Im Gegensatz zum Stuhlvirus lag die Hauptbande der Partikel aus Zellkulturüberständen bei 1,32g/cm^3. Diese Differenz wurde mit der möglichen Anlagerung von Zellproteinen an die Viruspartikel begründet (17).

Untersuchungen von Coulepis und Mitarbeiter (5, 6), Tratschin und Mitarbeiter (50) und Gerlich und Mitarbeiter (26) gaben Hinweise auf die Zusammensetzung der Strukturproteine des HAV. Vier charakteristische Polypeptide konnten in markiertem, gereinigtem Stuhlvirus als HAV-spezifisch identifiziert werden: VP 1 (33kD), VP 2 (26kD), VP 3 (23kD), VP 4 (14kD).

Die endgültige Klassifizierung des HAV hängt von der Art der Nukleinsäure ab. Aus den frühen Studien von Provost und Mitarbeiter (40) wurde bereits geschlossen, daß das HAV zu den RNA-Viren gehört. Schließlich konnten Coulepis und Mitarbeiter (7) und Siegl und Mitarbeiter (47) nachweisen, daß das genetische Material des HAV aus einer einsträngigen RNA mit einem Molekulargewicht von ca. 2 x 10^6 Daltons und einer Sedimentationskonstanten von ca. 33s besteht (7).

Hervorzuheben ist die besondere Stabilität des HAV gegenüber Äther, Säure (pH 3), Formaldehyd (bis 1 : 4000) und Hitze (60°C, 60 Minuten). Das HAV kann von den Vertretern der Picornaviren durch die bemerkenswerte Stabilität bei höheren Temperaturen, das Fehlen eines cytopathischen Effektes und durch bisher unbekannte sekundäre Strukturen im viralen Genom abgegrenzt werden. Diese Widersprüche bedürfen der weiteren Klärung, bevor das HAV definitiv klassifiziert werden kann.

Da die bisherigen Informationen über das HAV mit Antigen unterschiedlichster Herkunft gewonnen wurden, muß eine weitgehende Übereinstimmung der Aussagen verschiedener Autoren erreicht werden, bevor das Virus eindeutig definiert werden kann. Das Ziel vorliegender Arbeit besteht darin, einen Beitrag zur weiteren Charakterisierung des in vitro auf Frhk-4/R, bzw. HFS-Zellen, vermehrten HAV zu leisten.
Verglichen mit dem Stuhlvirus ist die Ausbeute des auf Zellkulturen gezüchteten Virus wesentlich geringer. Daher gilt das vorrangige Interesse den Konzentrierungsmöglichkeiten des Antigens, bevor es nach verschiedenen Reinigungsverfahren charakterisiert werden soll. Die Charakterisierung umfaßt die Antigenität, die Infektiosität, die Sedimentationskonstante und die Strukturproteine des Antigens.

2. Material

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt benutzt.

Acrylamid	Serva, Heidelberg
N'N-Methylenbisacrylamid	
Dodecylsulfat, Na-Salz	
Silbernitrat	Riedel-de Haën, Seelze
Glutardialdehyd	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Electrophoresis Calibration Kit, LMW	Pharmacia, Uppsala
DEAE Sephacel	
Sephadex G 50	
^{125}J Amershan B	Amershan Buchler, Braunschweig

2.2 Lösungen, Medien und Seren

PBS pH 7,2 (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)

85g NaCl in 500ml Aqua dest. lösen, 14,23g Na_2HPO_4 x 12 H_2O und 1,35g KH_2PO_4 zugeben, mit Aqua dest. auf 10l auffüllen.

Bradford Reagens

100mg Coomassie Brilliant Blue G-250 in 50ml 95% Äthanol lösen. Zugabe von 100ml 85% Phosphorsäure. Auf 1l mit Aqua bidest. auffüllen.

Tris-Glycin Elektrodenpuffer

0,025M Tris
0,192M Glycin pH 8,3
0,1% SDS

Tris-SDS Stammlösung

0,25M Tris
0,2% SDS pH 6,8
in Aqua dest.

Tris-SDS Stammlösung

0,75M Tris
0,2% SDS pH 8,8
in Aqua dest.

Probenpuffer

0,0625M Tris pH 6,8
2% SDS
10% Glycerin
5% 2-Mercaptoaethanol
0,01% Bromphenolblau

Ammoniumpersulfat-Lösung

1%, in Aqua dest.
frisch herstellen!

Acrylamid Stammlösung für 10%iges Gel

30% Acrylamid
0,8% N'N-Methylenbisacrylamid,
in Aqua dest.

Trenngel Lösung für 10%iges Gel (für 2 Gele)

19,8ml Acrylamid Stammlösung
30ml Tris Stammlösung pH 8,8,
mit Aqua dest. auf 60ml auffüllen,
entgasen, Zugabe von 15µl TEMED und
1,5ml Ammoniumpersulfat-Lösung

Sammelgel Lösung für 10%iges Gel (für 2 Gele)

10ml Tris Stammlösung pH6,8,
mit Aqua dest. auf 20ml auffüllen.
entgasen, Zugabe von 5µl TEMED und
0,5ml Ammoniumpersulfatlösung

Acrylamid Stammlösung für Gradientengel

40% Acrylamid
0,73% N'N-Methylenbisacrylamid,
in Aqua dest.

Trenngel Lösungen für Gradientengel (für 1 Gel)

8%: 3ml Acrylamid Stammlösung
7,65ml Tris-SDS Stammlösung
pH 8,8
0,375ml Ammoniumpersulfat-Lösung
3,97ml Aqua dest.,
nach dem Entgasen Zugabe von 0,03ml
TEMED

18%: 6,75ml Acrylamid Stammlösung
7,65ml Tris-SDS Stammlösung
pH 8,8
0,375ml Ammoniumpersulfat-Lösung
0,3ml Aqua dest.,
nach dem Entgasen Zugabe von 0,03ml
TEMED

Alle Lösungen für die Elektrophorese müssen filtriert werden!

Glutardialdehyd-Lösung

9,5g $Na_2B_4O_7$ x 10 H_2O in 480ml
Aqua dest. lösen, Zugabe von 20ml
Glutardialdehyd

Silbernitrat-Lösung

19ml Aqua dest.
1,84ml 1M NaOH
1,96ml 25% Ammoniaklösung
4ml 20% Silbernitrat (in Aqua dest. gelöst),
mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

Reduktions-Lösung

10ml absoluter Alkohol
0,6ml 1% Zitronensäure
25 µl 37% Formaldehyd,
mit Aqua dest. auf 100ml auffüllen

Minimal Essential Medium mit Hanks Salzen — Serva, Heidelberg

0,7g/l $NaHCO_3$
1ml/l Penicillin-Streptomycin-Mischung

Minimal Essential Medium mit Earle's BSS — Serva, Heidelberg

2,2g/l $NaHCO_3$
1ml/l Penicillin-Streptomycin-Mischung

Penicillin-Streptomycin-Mischung

100 IE/ml Penicillin G-Na
100 µg/ml Streptomycinsulfat

Kälberserum — Flow Laboratories, Bonn

Versen Trypsin

0,25% Trypsin in PBS gelöst	2 Teile
Versen (Titriplex) 1: 5000	1 Teil

Haemocyanin

Zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Strohmeier, Tübingen

Anti-HAV positive Humanseren,
Anti-HAV negative Humanseren

Zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen

2.3 Zellen

Zellinie von fötalen Rhesus-Affennieren (Frhk-4/R);
Menschliche embryonale Lungenfibroblasten, Zellstamm Nr. 3;
Zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen.

2.4 Virusstämme

Hepatitis A-Virus, GBM
Zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen

Polio Virus, Typ I
Zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Gerth, Tübingen

Tabak Mosaik Virus
Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Sanders, Tübingen

3. Methoden

3.1 Methoden zur Konzentrierung des HAV

3.1.1 Ultrazentrifugation

Überstände von HAV beimpften Frhk-4/R Zellen wurden von Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei 4000 U/min in der Kühlzentrifuge (Rotixa/K 7202, Hettich, Tuttlingen) gereinigt und das Virus anschließend durch Ultrazentrifugation pelletiert. Zentrifugiert wurde 14 Stunden bei 4°C und ca. 42 000g, bzw. 2 Stunden bei 201 800g in einem Typ 21-, bzw. SW 40 Ti Rotor in der L8 70 Ultrazentrifuge (Beckman, München). Da das HAV möglicherweise nicht vollständig pelletiert worden war, mußte der Überstand mit dem RIA auf Antigenität getestet werden. Wenn keine Antigenität mehr nachgewiesen werden konnte, wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit PBS resuspendiert.

3.1.2 Ammoniumsulfatfällung

Zu Zellüberständen von HAV infizierten Frhk-4/R Zellen wurde langsam und unter ständigem Rühren 25% Ammoniumsulfat zugegeben. Das gefällte Protein bewirkte dabei eine deutliche Trübung. Das Gemisch wurde dann 30 Minuten weitergerührt und blieb 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen. Anschließend wurde das Präzipitat in der Stock Zentrifuge (Marburg) 30 Minuten bei Stufe II (4000g) sedimentiert und nach Verwerfen des Überstandes in Aqua dest. resuspendiert. Damit ungelöste Proteinbestandteile entfernt werden konnten, erfolgte eine weitere Zentrifugation in der Kühlzentrifuge über 10 Minuten bei Stufe VI. Zur Entfernung des Ammoniumsulfates wurde der Überstand zuerst gegen Aqua dest., dann gegen PBS dialysiert.

3.2 Methoden zur Reinigung des konzentrierten HAV

3.2.1 Isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation

Von De Duve (1959) (11) und Meselson (1957) (32) wurde die Methode der isopyknischen Dichtegradienten-Zentrifugation entwickelt. Sie basiert auf der Eigenschaft von Schwermetallsalzen, bei hohen g-Zahlen einen annähernd linearen Dichtegradienten zu bilden und damit Makromoleküle, Viren und subzelluläre Partikel nach ihrer Schwimmdichte aufzutrennen. Die verschiedenen Partikel werden dabei in jenen Zonen des Gradienten angesammelt, die ihrer Dichte entsprechen. Sie befinden sich somit im Gleichgewicht mit dem Gradienten. In dieser Arbeit wurden zur Herstellung des Gradienten Caesiumchloridlösungen mit der Dichte von 1,11g/cm^3 und 1,47g/cm^3 verwendet. Der Gradient wurde dann mit einer konzentrierten HAV-Suspension überschichtet. Anschließend wurde 18 Stunden lang bei 10°C und 145 650g im SW 40 Ti Rotor (Schwenkbecherrotor) zentrifugiert.

3.2.2 Zonendichtegradienten-Zentrifugation

Die Technik der Zonendichtegradienten-Zentrifugation wurde von Brakke 1951 (4) eingeführt und beruht darauf, daß Partikel entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten verschieden schnell wandern und Zonen bilden. Die Dichtekapazität des Gradienten ist gering und dient nur zur Stabilisierung der Sedimentation der Partikel. Ein Dichtegleichgewicht wird nicht angestrebt.
Als geeignete Gradientenlösungen wurden in diesen Versuchen 10%ige und 30%ige Saccharoselösungen verwendet. Nach Überschichten des Gradienten mit HAV-Suspension wurde 1 Stunde lang bei 4°C und 181 900g im SW 40 Ti Rotor zentrifugiert. Die Zone des HAV wurde nach Abnahme von 0,5ml-Fraktionen mit dem RIA bestimmt.

3.2.3 Immunpräzipitation

Hepatitis A-Virussuspension wurde 2 Tage bei 4°C mit gereinigtem Anti-HAV-IgG inkubiert. Anschließend wurde das Immunpräzipitat 2 Stunden bei 12 600g abzentrifugiert und in PBS resuspendiert.
Zur Überprüfung, ob das HAV quantitativ präzipitiert worden war, mußte der Überstand mit dem RIA auf Antigenität getestet werden. Bei gelungener Immunpräzipitation konnte keine Antigenität mehr nachgewiesen werden.

3.3 Isolierung von IgG aus Serum

Die Proteine des Serums wurden mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung pH 6,8 gefällt (Serum : Ammoniumsulfat = 2 : 1). Die Fällung wurde 30 Minuten bei 3000 U/min abzentrifugiert, mit PBS aufgenommen, und gegen 0,02M Phosphatpuffer pH8 dialysiert. Anschließend wurde die Suspension auf eine mit DEAE gefüllte Säule, die mit 0,02M Phosphatpuffer pH8 equilibriert worden war, aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde mit demselben Puffer eluiert. Fraktionen von je 1ml wurden abgenommen und deren Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt. In den ersten beiden Fraktionen ergab sich ein Proteinpeak, der dem IgG entsprach.

3.4 Proteinbestimmung nach Bradford (2)

In dem Verfahren von Bradford wird Coomassie Brillant Blue G-250 an Protein gebunden. Dadurch wird das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465nm auf 595nm verschoben. Die Proteinkonzentration ergibt sich aus der Zunahme der Absorption bei 595nm.

In Anlehnung an Bradford wurden zur Durchführung der Proteinbestimmung 10 µl der Proteinproben mit jeweils 90 µl "Bradford-Reagens" versetzt und innerhalb von 5 Minuten im Dynatech Photometer (MR 580 Microelisa Reader) gemessen. Anhand der Eichkurve, die aus verschiedenen Rinder-Serumalbumin-Konzentrationen erstellt wurde, konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.5 Antigennachweis mit Radioimmunoassay

Auf der Grundlage des von Purcell (41) beschriebenen Festphasenradioimmunoassays ist von Flehmig (15, 21) der Antigennachweis zur Routinediagnostik von Hepatitis A-Infektionen entwickelt worden.
Entsprechend dieser Methode wurden in den hier durchgeführten Versuchen spezifische Antikörper gegen HAV (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen) an die Näpfchenoberfläche von PVC-U Mikrotiter Platten (Dynatech, Nürtingen/FRG) gebunden. Nach dreimaligem Waschen mit Aqua dest. wurden 100 µl Antigen, bzw. die auf Antigenität zu testende Probe, in jedes Näpfchen pipettiert und 1-2 Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Nichtgebundenes Antigen wurde durch mehrmaliges Waschen entfernt. Daraufhin wurde in jedes Näpfchen 50 µl eines mit ^{125}J markierten spezifischen Antikörpers (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen) zugegeben. An die noch freien Stellen des gebundenen Antigens wurde der markierte Antikörper gebunden. Nichtgebundener Antikörper mußte wieder durch Waschen entfernt werden. Die gebundene Radioaktivität jedes Näpfchens, die der Menge des Antigens entsprach, wurde im Gamma-Counter (LB 2100, Berthold) gemessen.

3.6 Herstellung von Zellkulturen

Die zur Vermehrung von Hepatitis A-Virus verwendeten Zellkulturen aus einer fötalen Rhesus-Affennieren Zelllinie sind von Flehmig (16) aus einer vom Bureau of Biologics, Bethesda, zur Verfügung gestellten Primärkultur selektiert worden.
Zur Herstellung der Kulturen wurden Frhk-4/R Zellen mit Versen-Trypsin suspendiert und im Verhältnis 1 : 2 mit Anwachsmedium MEM Hanks + 10% FKS ausgesät. Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen mit Erhaltungsmedium MEM Earle's + 4% FKS versorgt.

3.7 Methode zum Nachweis der Infektiosität

Zur Bestimmung des Infektiositätstiters mußte die verwendete Virussuspension mit MEM Earle's + 10% FKS Medium von 10^{-2} bis 10^{-8} austitriert werden.
In Greiner Mikrotiter Platten (Nürtingen) wurden Frhk-4/R Zellen mit MEM Hanks + 10% FKS Medium ausgesät. Nach 2-3 Tagen wurde das Medium abgenommen und in jedes Näpfchen 150µl der verdünnten Virussuspension pipettiert. Die beimpften Zellen inkubierten 14 Tage bei 37°C in einer mit 5% CO_2 angereicherten Atmosphäre.
Zur Freisetzung des zellgebundenen Virus wurden dann die Zellen dreimal eingefroren und aufgetaut (16). Jeweils 100µl des Überstandes wurde mit dem RIA auf Antigenität getestet und der Infektiositätstiter $TCID_{50}$ nach Kärber (28) bestimmt.

3.8 Markierung des HAV

Nach der von Coulepis und Mitarbeiter (5) beschriebenen Methode wurde gereinigtes und konzentriertes HAV mit ^{125}J markiert. Dazu wurde 10µl HAV mit 20µl Phosphat-

puffer pH 7,4 (0,066M KH_2PO_4 + 0,066M Na_2HPO_4 x 2 H_2O) verdünnt, mit 0,2mCi Na-^{125}J gemischt und anschließend 10µl Chloramin T-Lösung (3,5mg/ml in Aqua bidest.) zugegeben. Die Reaktionszeit betrug 15 Minuten. Die Reaktion, die bei Raumtemperatur stattfand, wurde mit 10µl Natriummetabisulfit (4,8mg/ml) gestoppt. Nach Zugabe von 10µl Natriumjodid (10mg/ml) wurde das Volumen der Reaktionsmischung mit Phosphatpuffer pH 7,4 auf 100µl aufgefüllt. Ungebundenes ^{125}J wurde vom virusgebundenen ^{125}J durch eine Sephadex G 50-Säule (26cm x 1,5cm) abgetrennt. Die Counts der 1ml-Fraktionen wurden im Gamma-Counter gezählt.

3.9 Bestimmung der Sedimentationskonstanten

Die Sedimentationskonstante des HAV wurde durch den Vergleich mit Referenzproben, deren S-Werte bekannt waren, ermittelt. Dazu standen folgende Vergleichsmaterialien zur Verfügung: Tabak Mosaik Virus (190s), Polio Virus (160s) (23) und Haemocyanin (100s). Jeweils 100µl der Referenzproben und 50µl der HAV-Suspension wurden auf einen Saccharosegradienten aufgegeben. Der Saccharosegradient wurde aus einer 10%igen und 30%igen Lösung in PBS, pH 6,0 hergestellt.
Da das Haemocyanin bei höheren pH-Werten in Komponenten mit verschiedenen Sedimentationskonstanten zerfallen würde, mußte die Saccharoselösung auf einen pH von 6 eingestellt werden. Sowohl das Polio Virus und TMV, als auch das HAV bleiben bei niedrigem pH stabil und konnten daher zusammen und unter identischen Bedingungen in einem Röhrchen zentrifugiert werden. Dadurch wurden mögliche Fehlerquellen und Ungenauigkeiten gering gehalten.
Die Zentrifugation erfolgte bei 5°C und 18l 900g 80 Minuten lang.

Die Bande des Tabak Mosaik Virus und des Haemocyanins konnten dann im Streulicht identifiziert werden. Die Lokalisation wurde am Röhrchen markiert. Die Bande des Haemocyanins wurde zusätzlich durch Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach Bradford ermittelt. Jeweils 0,4ml pro Fraktion wurden entnommen und nach jeder Entnahme der Meniskus am Röhrchen markiert, sodaß der genaue Abstand jeder Fraktion vom Röhrchenende (Gesamtlänge der Röhrchen 9,5cm) bestimmt werden konnte. Nach der Dichtebestimmung der Fraktionen im Refraktometer wurde die Lokalisation des HAV mit dem RIA bestimmt. Zur Identifizierung des Polio Virus wurden Frhk-4/R Zellen, bzw. HFS Zellen, mit den dialysierten und bis 10^{-8} austitrierten Fraktionen beimpft. Anhand des cytopathischen Effektes wurde der Titer nach Kärber bestimmt und anschließend die Lokalisation des Polio Virus ermittelt.
Die gemessenen Abstände (in cm) vom Röhrchenende der drei Referenzproben wurden gegen die bekannten Sedimentationskonstanten aufgetragen. Aus der Geraden konnte durch den ermittelten Abstand des HAV der S-Wert bestimmt werden.

3.10 Methoden zur Darstellung der Virusproteine

3.10.1 Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Protein-Untereinheiten des konzentrierten und gereinigten HAV wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese dargestellt. Auf der Grundlage des von Lämmli (29) beschriebenen Tris-Glycin-Puffer-Systems wurde eine vertikale Flachgel Disk-Elektrophorese durchgeführt. Die Disk-Elektrophorese bewirkte mit Hilfe eines diskontinuierlichen Spannungsgradienten einen Konzentrierungseffekt und damit eine verbesserte Auflösung (8, 36).

3.10.1.1 Disk-Elektrophorese

Nach der Methode von Lämmli wurde ein 3%iges Sammelgel und ein 10%iges Trenngel verwendet.
Die Durchführung der Elektrophorese gliederte sich in folgende Arbeitsschritte:
1. Nach Entgasen der Trenngel-Lösung wurde die Polymerisation durch Zugabe von TEMED gestartet. Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von 12cm in die vorbereiteten Gelplatten pipettiert. Der Durchmesser des Gels betrug 1,5mm. Nach dem Überschichten mit Aqua dest. mit Hilfe einer Varioperpex Pumpe (LKB), polymerisierte das Gel über Nacht bei Raumtemperatur.
2. Das überschichtete Wasser wurde abgegossen und mit der Varioperpex Pumpe das restliche Wasser abgepumpt. Die Oberfläche des Trenngels mußte trocken sein, damit eine befriedigende Polymerisierung an der Grenzfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zustande kam. Die entgaste Sammelgel-Lösung wurde dann auf das Trenngel pipettiert. Nach 2-stündiger Polymerisation bei Raumtemperatur wurden die Proben in die Geltaschen gefüllt, nachdem sie 5 Minuten mit gleicher Menge Probenpuffer aufgekocht worden waren.
3. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 20mA pro Gel, bzw. 40mA bei gleichzeitigem Lauf von 2 Gelen, bei 15°C durchgeführt. Sobald die Bromphenolblau-Linie 1cm über dem unteren Gelrand angelangt war, wurde die Elektrophorese beendet.

3.10.1.2 Gradientengel

Zur Optimierung der Trennung von Proteinuntereinheiten und zur Verbesserung der Bandenschärfe wurde ein Gradientengel angefertigt. Dabei wurde nach der

Methode von Lugtenberg (30) verfahren.
Aus 40%iger Acrylamid Stammlösung wurden eine 8%ige und eine 18%ige Trenngel-Lösung hergestellt. Nach der Vorbereitung der Glasplatten und dem Entgasen der Lösungen wurde das Trenngel in den Gradientenmischer gegossen und erst dann TEMED zugegeben. Das Gießen in die Gelplatten mußte bei 4°C durchgeführt werden, da das Gel bei Raumtemperatur bereits im Gradientenmischer während des Eingießens polymerisieren würde. Das mit Aqua dest. überschichtete Trenngel polymerisierte bei 4°C über Nacht. Ein 3%iges Sammelgel wurde am nächsten Tag auf das Trenngel pipettiert.
Die Elektrophorese wurde unter gleichen Bedingungen wie die Disk-Elektrophorese durchgeführt. Der Lauf wurde jedoch erst 60 Minuten, nachdem die Bromphenolblau-Linie das untere Ende des Gels erreicht hatte, beendet.

3.10.2 Färbemethoden

a) Coomassie-Färbung

Das Gel wurde 30 Minuten in einer Lösung aus 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250, 9,2% Eisessig und 50% Methanol gefärbt und über Nacht mit einer Lösung aus 5 Teilen Methanol, 1 Teil Eisessig und 5 Teilen Aqua dest. entfärbt.

b) Silberfärbung

Die von Oakley und Mitarbeiter (35) weiterentwickelte Methode der Silberfärbung wird von R. M. Tanguay (persönliche Mitteilung) modifiziert dargestellt.
Nach diesem Verfahren wurde das Gel in 10% Trichloressigsäure (90 Minuten) fixiert und über Nacht in eine

Lösung aus Methanol, Eisessig und Aqua dest. (5 : 1,2 : 3,8) gelegt. Am nächsten Tag wurde die Lösung gewechselt und 30 Minuten mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurde das Gel mit einer Lösung aus 1% Glutardialdehyd und 0,05M $Na_2B_4O_7 \times 10\ H_2O$ versetzt und 15 Minuten inkubiert. Nach gründlichem Waschen mit Aqua dest. (3 x 20 Minuten) wurde mit alkalischer Silbernitratlösung gefärbt (exakt 20 Minuten), nochmals mit Aqua dest. gewaschen und schließlich die Banden mit der Reduktionslösung sichtbar gemacht.

3.10.3 Autoradiographie

Die Methode basiert auf der Beschreibung von Coulepis und Mitarbeiter (5).
Nach elektrophoretischer Auftrennung von ^{125}J-HAV wurde das Gel 30 Minuten mit 5% Eisessig fixiert und 2 Tage in einer Standard-Röntgenfilmkassette exponiert. Die Exposition des Kodak X-Omat Röntgenfilms erfolgte bei 4°C, bzw. -70°C. Zur Verstärkung der Belichtung des Films wurde eine Verstärkerfolie (Cronex Quanta III E.I. Du Pont de Nemours/Co, Wilmington) verwendet. Der Film wurde dann 5 Minuten mit DX 80 (Kodak) entwickelt und 5 Minuten mit Hypam (Ilford) fixiert.

3.11 Bestimmung des Molekulargewichts (44, 51)

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten Molekulargewichte unbekannter Proteine durch Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit mit einem definierten Proteinstandard bestimmt werden. Die Wanderungsstrecken der einzelnen Proteine des Standards wurden

abgemessen und der R_f-Wert berechnet. Dazu wurde der Quotient aus der Entfernung des Proteins vom Ausgangspunkt und der Distanz vom Ausgangspunkt zum Referenzpunkt gebildet. Als Referenzpunkt diente die Bromphenolblau-Linie am unteren Rand des Gels. Weil beim Gradientengel die Farbstofflinie immer vollständig aus dem Gel herauslief, wurde das untere Gelende als Referenzpunkt angenommen.
Die R_f-Werte wurden dann gegen den Logarithmus der entsprechenden Molekulargewichte aufgetragen. Dies ergab eine Gerade, aus der die Molekulargewichte unbekannter Proteine abgelesen werden konnten, nachdem zuvor deren R_f-Werte berechnet worden waren.

4. Versuche und Ergebnisse

4.1 Untersuchungen im Verlauf der Konzentrierung des Hepatitis A-Virus durch Ultrazentrifugation

Überstände von HAV infizierten Frhk-4/R Zellen (HAV/Frhk-4/R) wurden durch dreimalige Ultrazentrifugationen 2000-fach konzentriert. Nach jeder Ultrazentrifugation wurde das mit PBS resuspendierte Pellet abzentrifugiert und das Sediment mit Ultraschall behandelt. Dies sollte die Freisetzung des Virus aus Aggregaten bewirken. Die Überstände mit dem freigesetzten Virus konnten dann als konzentrierte Virussuspension gepoolt werden. Vor der Weiterverarbeitung wurde die HAV-Suspension 2 Stunden lang bei 20l 800g durch eine 30%ige Saccharoselösung zentrifugiert und das resuspendierte Pellet mit Genetron ausgeschüttelt. Dadurch wurde eine grobe Vorreinigung erreicht.

4.1.1 Bestimmung der Antigenität im Verlauf der Konzentrierung

Mit dem RIA konnte nach jedem Konzentrierungsschritt das Virus in höheren Verdünnungen nachgewiesen werden (Abb.1). Die Überstände wurden zur Kontrolle ebenfalls mit dem RIA getestet und dabei nach jeder weiteren Ultrazentrifugation zunehmende Antigenität festgestellt. Diese Partikel blieben im Überstand und konnten nicht pelletiert werden.

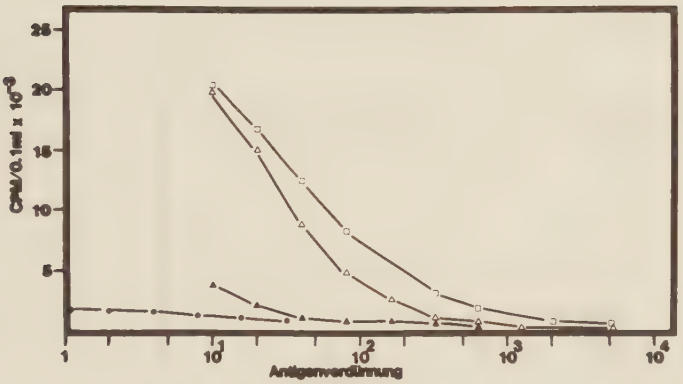

Abb.1: Bestimmung der Antigenität des HAV/Frhk-4/R im Verlauf der Konzentrierung durch mehrmalige Ultrazentrifugationen;
Ausgangsmaterial (●), nach der 1. Ultrazentrifugation (▲), nach der 2. Ultrazentrifugation (△), nach der 3. Ultrazentrifugation (□).

4.1.2 Reinigungsverfahren

4.1.2.1 Caesiumchlorid-Gradient

Die konzentrierte Virussuspension wurde durch einen Caesiumchlorid-Gradienten mit der Dichte von 1,11g/cm^3 bis 1,44g/cm^3 in Nitrozellulose Röhrchen zentrifugiert. Danach waren drei Banden sichtbar: in Fraktion 14 und 15 eine gelblich gefärbte, in Fraktion 16 eine milchig trübe und in Fraktion 17 eine flockige Bande. Insgesamt wurden 24 Fraktionen à 0,5ml abgenommen, mit Ausnahme von Fraktion 15 und 16, deren Volumen 0,3ml betrug. Von jeder Fraktion wurde die Dichte im Refraktometer (Leitz, Wetzlar) bestimmt und die Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt. Die Antigenität

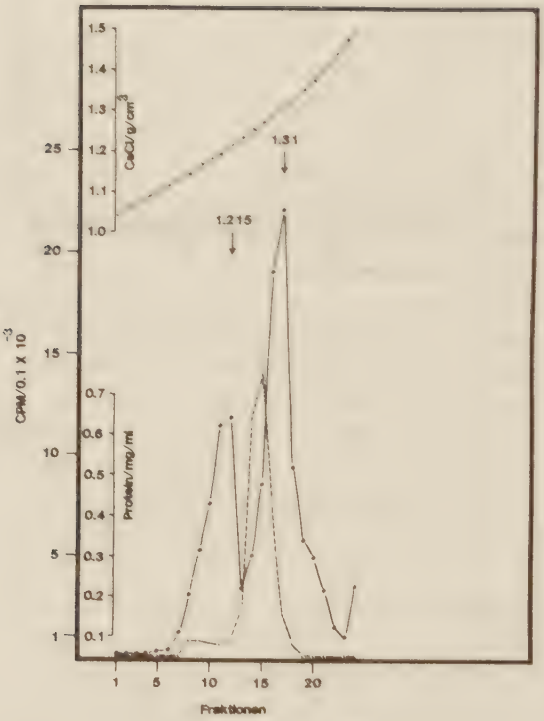

Abb.2: Caesiumchlorid-Gradienten-Zentrifugation der konzentrierten HAV/Frhk-4/R-Suspension.
Antigenität: ——•——
Proteinkonzentration: —▪—▪—
Dichte: ———

wurde mit dem RIA gemessen. Wie aus Abb.2 ersichtlich ist, liegt der erste Antigenitätspeak im Bereich der Dichte 1,165 - 1,215g/cm^3 und der zweite Antigenitätspeak im Bereich der Dichte 1,255 - 1,35g/cm^3. Die höchsten Proteinkonzentrationen enthielten Fraktion 14 und 15, die der gelblich gefärbten Bande entsprachen.

4.1.2.2 Saccharosegradient

Nach der Dialyse gegen PBS wurden die Fraktionen 10, 11 und 12 des 1. Antigenitätspeak des Caesiumchlorid-Gradienten (zugehörige Dichte 1,18 - 1,215g/cm^3), und die Fraktionen 16, 17 und 18 des 2. Antigenitätspeak (zugehörige Dichte 1,29 - 1,33g/cm^3) gepoolt. Mit jeweils 1,2ml der Pools wurden Saccharosegradienten (hergestellt aus einer 10%- und 30%igen Lösung) überschichtet. Nach der 60 Minuten dauernden Zentrifugation wurden 0,5ml-Fraktionen entnommen, deren Proteinkonzentrationen nach Bradford bestimmt und die Antigenität mit dem RIA gemessen. Wie Abb.3 und Abb.4 zeigen, lag der Antigenitätspeak des 1. Peak-Pools bei Fraktion 7, des 2. Peak-Pools bei Fraktion 11. Beim 2. Peak-Pool wurden in den ersten fünf Fraktionen Proteinkonzentrationen gemessen, die kleiner als 0,05mg/ml waren, beim 1. Peak-Pool kleiner als 0,02mg/ml. Das weist auf einen erheblichen Reinigungseffekt hin, der durch die Gradientenzentrifugation erreicht wurde.

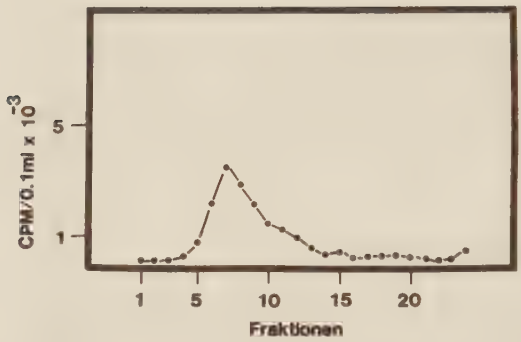

Abb.3: Bestimmung der Antigenität der 1,19 - 1,215g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel nach der Saccharosegradienten-Zentrifugation.

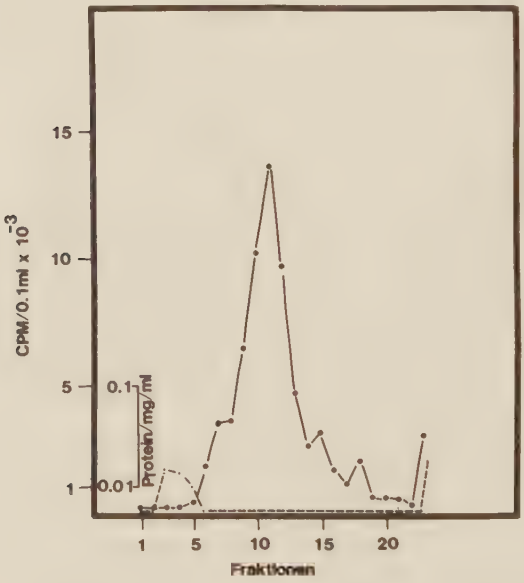

Abb.4: Bestimmung der Antigenität der 1,29 - 1,33g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel nach der Saccharosegradienten-Zentrifugation.
Antigenität: ——•—— Proteinkonzentration:—•—•—

4.1.3 Darstellung der Proteine während des Konzentrierungs- und Reinigungsverlaufes durch Gelelektrophorese

Nach der unter 3.10.1.1 und 3.10.2 beschriebenen Methode wurden die Protein-Untereinheiten der HAV-Suspensionen bzw. -Konzentrate im 10%igen Polyacrylamidgel mit der Silberfärbung dargestellt. Auf diese Weise sollten Rückschlüsse auf Reinheit und Darstellung der Proteine des HAV ermöglicht werden.
Aus Abb.5 wird ersichtlich, daß nach jeder Ultrazentrifugation die Zahl der Banden zunahm und sie stärker konzentriert im Gel erschienen. Dies bedeutet, daß mit dem Virus auch unspezifische Proteine konzentriert worden waren.

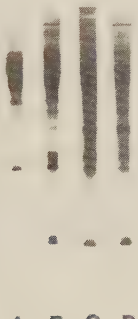

Abb.5: Polyacrylamidgelelektrophorese der HAV/Frhk-4/R-Suspension vor der Konzentrierung (A), nach der 1. Ultrazentrifugation (B), nach der 2. Ultrazentrifugation (C) und nach der 3. Ultrazentrifugation (D) (Silberfärbung).

Die in Abb.6 dargestellten Bandenmuster der Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten zeigen eine deutliche Zunahme und Intensivierung der Banden im Bereich des 1. (Fraktion 9 - 12) und 2. (Fraktion 15 - 17) Antigenitätspeaks. Da die höchsten Proteinkonzentrationen ebenfalls in diesem Bereich (Fraktion 14 und 15) lagen, konnte keine Aussage über die Banden des HAV gemacht werden, da es wahrscheinlich zur Überlagerung von Virusproteinen durch unspezifische Proteine kam.

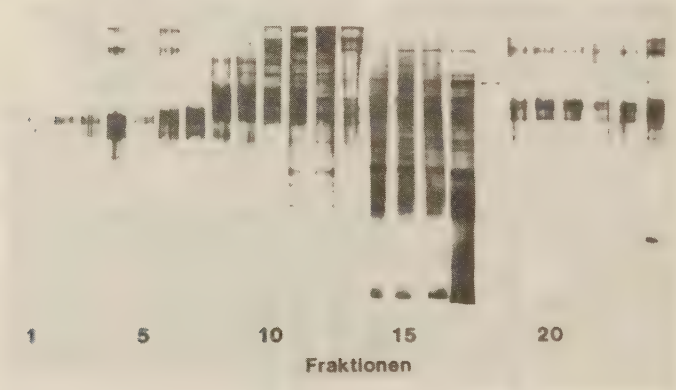

Abb.6: Auftrennung der Proteine der einzelnen Fraktionen des CsCl-Gradienten durch Polyacrylamidgelelektrophorese (10%ige Acrylamidkonzentration) und Darstellung der Proteinbanden mit der Silberfärbung.

Dagegen waren die Bandenmuster der Fraktionen des Saccharosegradienten in Abb.7 deutlich reduziert, was auf den Reinigungseffekt des Gradienten zurückzuführen ist. Die Silberfärbung wurde jedoch aufgrund der relativ hohen Proteinkonzentrationen im oberen Molekulargewichtsbereich nur kurz durchgeführt, sodaß die gering konzentrierten Proteine, damit wahrscheinlich auch die

Virusproteine, nicht ausreichend dargestellt werden konnten. Möglicherweise lag auch die Konzentration der Virusproteine noch unterhalb der Nachweisgrenze.

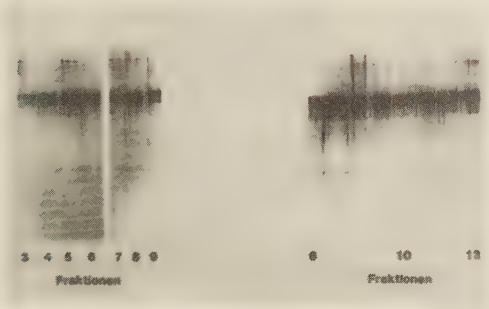

Abb.7: Fraktionen des Saccharosegradienten der 1,19 - 1,215g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel (Antigenitätspeak Fraktionen 6 - 9) (links);
Fraktionen des Saccharosegradienten der 1,29 - 1,33g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel (Antigenitätspeak Fraktionen 6 - 13) (rechts).

4.1.4 Nachweis der Infektiosität

Mit dem Infektiositätsnachweis sollte außer der Titerbestimmung des konzentrierten HAV untersucht werden, ob die Antigenitätspeaks mit den Fraktionen höchster Infektiosität übereinstimmen.

4.1.4.1 Infektiositätsnachweis der Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten

Zur Bestimmung des Infektiositätstiters wurden Frhk-4/R Zellen mit den Fraktionen des CsCl-Gradienten in den Verdünnungsstufen 10^{-2} bis 10^{-8} infiziert. Nach 14 Tagen wurde mit dem RIA das neu gebildete HAV-Antigen bestimmt und die $TCID_{50}$ nach Kärber errechnet.
Der Infektiositätstiter der 1,18 - 1,215g/cm^3 Partikel betrug 10^7 bis 10^8 und der 1,29 - 1,33g/cm^3 Partikel 10^7 bis $10^{7,5}$ (Abb.8). Demnach entsprachen die Peakfraktionen der Antigenität den Fraktionen hoher Infektiosität (vgl. auch Abb.2).

4.1.4.2 Infektiositätsnachweis der Fraktionen des Saccharosegradienten

Die gepoolten Fraktionen des CsCl-Gradienten mit der Dichte 1,18 - 1,215g/cm^3 und 1,29 - 1,33g/cm^3 wurden über einen Saccharosegradienten (hergestellt aus 10%- und 30%igen Lösungen) zentrifugiert (1 Stunde, 181 900g). Von den entnommenen 0,5ml-Fraktionen wurde nach Beimpfen von Frhk-4/R Zellen und anschließender Antigenitätsbestimmung mit dem RIA die $TCID_{50}$ nach Kärber errechnet.
Aus Abb.9a wird ersichtlich, daß der Infektiositätspeak der 1,18 - 1,215g/cm^3 Partikel mit dem Titer von $10^{4,5}$ bei den Fraktionen 11 und 12 lag, während

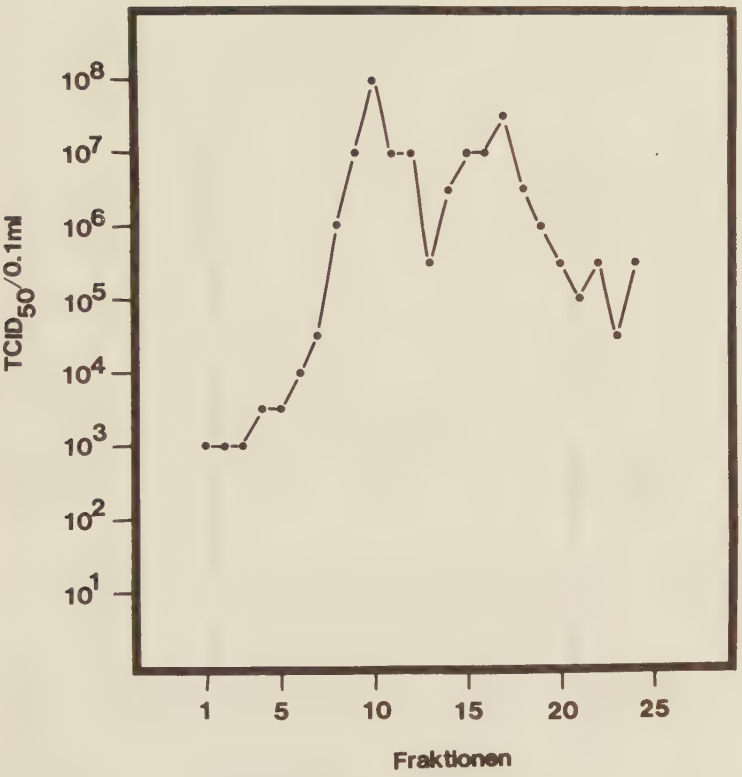

Abb.8: Bestimmung der Infektiosität der Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten.

geringere Infektiositäten in den Fraktionen 8 und 16 gemessen wurden. Bei den 1,29 - 1,33g/cm^3 dichten Partikel (Abb.9b) lag der Infektiositätspeak mit dem Titer von $10^{7,25}$ bei Fraktion 10 bis 12. Auch hier korrelierte die Infektiosität mit der Antigenität, wie ein Vergleich mit den Peaks der Antigenität (vgl. Abb.3 und Abb.4) beweist.
Die Ergebnisse zeigen, daß die Hauptinfektiosität mit den Partikeln der Dichte von 1,29 - 1,33g/cm^3 korrelierte.

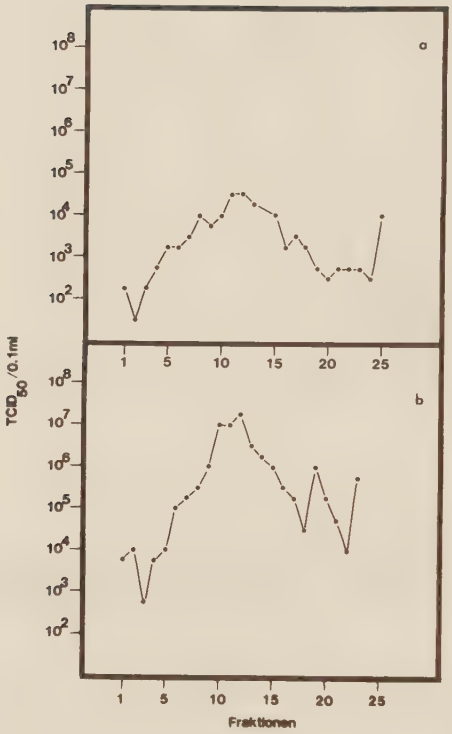

Abb.9: Bestimmung der Infektiosität der Fraktionen des Saccharosegradienten von 1,19 - 1,21g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel (a), 1,29 - 1,33g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel (b).

4.2 Untersuchungen im Verlauf der Konzentrierung des Hepatitis A-Virus durch Ammoniumsulfatfällung

Die Konzentrierung des HAV durch Fällung mit Ammoniumsulfat wurde durchgeführt, damit HAV Suspensionen in größeren Mengen und mit geringerem Zeitaufwand, als dies durch mehrmalige Ultrazentrifugationen möglich war, konzentriert werden konnten. Die Voraussetzung für den Einsatz der Ammoniumsulfatfällung für Charakterisierungsversuche mit dem HAV war allerdings, daß weder Antigenität noch Infektiosität des HAV durch hohe Ammoniumsulfatkonzentrationen beeinträchtigt wurden, was im folgenden gezeigt werden soll.

4.2.1 Bestimmung der Antigenität nach Ammoniumsulfatfällung und nachfolgenden Ultrazentrifugationen

Nach der unter 3.1.2 beschriebenen Methode wurden Überstände HAV infizierter Frhk-4/R Zellen mit Ammoniumsulfat gefällt. Das gefällte Material wurde 30 Minuten bei 3000g zentrifugiert, in PBS resuspendiert und gegen Aqua dest. dialysiert. Dabei fiel Protein aus, wobei es sich wahrscheinlich um Euglobulin handelte. Dies ging jedoch nach der Dialyse gegen PBS wieder in Lösung.
Da das Volumen weiter reduziert werden mußte, wurde ultrazentrifugiert (17 Stunden bei $4^{o}C$ und ca. 55 000g). Das Pellet wurde mit PBS aufgenommen und zur Freisetzung des Virus aus Aggregaten mit Ultraschall behandelt. Damit das Volumen noch mehr eingeengt wurde, erfolgten nochmals zwei Ultrazentrifugationen.
Dabei konnte festgestellt werden, daß zunehmende Mengen von HAV im Überstand blieben und die Konzentration im Pellet abnahm (Abb.10). Aufgrund dieser

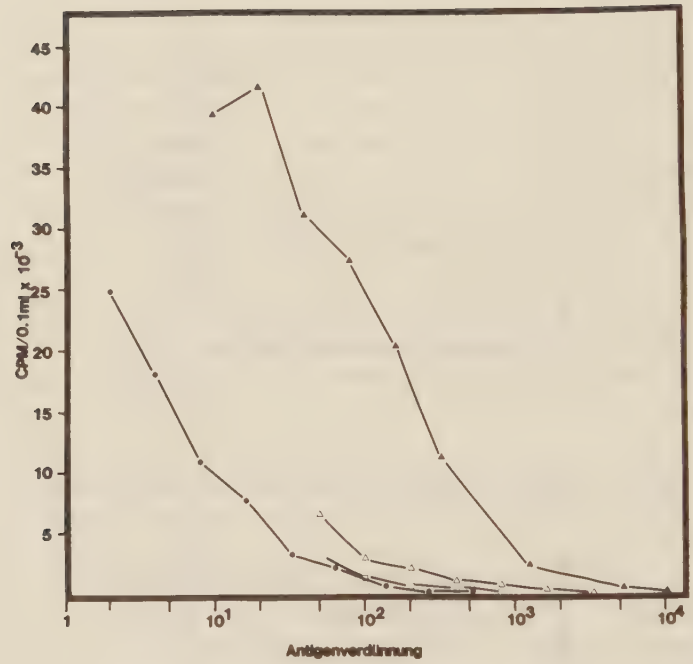

Abb.10: Bestimmung der Antigenität der HAV/Frhk-4/R-Suspension nach der Ammoniumsulfatfällug (•), nach der 1. Ultrazentrifugation (▲), nach der 2. Ultrazentrifugation (△) und nach der 3. Ultrazentrifugation (□).

Tatsache wurde im nächsten Versuch nach der Ammoniumsulfatfällung nur ein einziges Mal ultrazentrifugiert. Die Konzentrierung betrug dabei 1 : 5500. Die Antigenität der einzelnen Konzentrierungsschritte wurde mit dem RIA ermittelt. Sie sind in Abb.11 dargestellt.

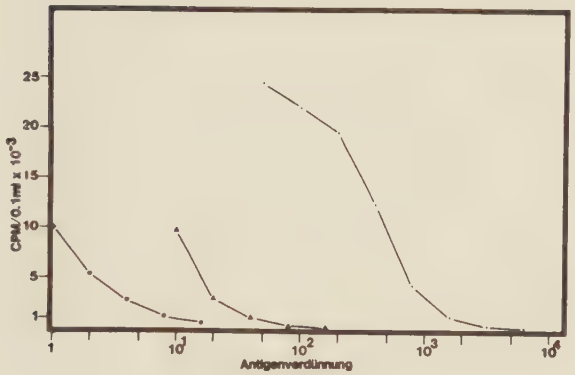

Abb.11: Bestimmung der Antigenität der HAV/Frhk-4/R-Suspension vor der Konzentrierung (●), nach der Ammoniumsulfatfällung (▲) und nach der Ultrazentrifugation (•).

Während des Konzentrierungsverfahrens wurden die Proteinkonzentrationen gemessen und die HAV-Titer anhand der RIA-Ergebnisse ermittelt. Die Daten der Konzentrierung sind in Tabelle I zusammengestellt.

	Volumen (ml)	Konzentrierung	Proteinkonz. (mg/ml)	HAV-RIA-Titer
Ausgangsmaterial	15000	0	2,1	1 : 16
Ammoniumsulfat gefälltes Material	300	1 : 50	10,79	1 : 160
Ultrazentrifugiertes Material	2,8	1 : 5500	113,0	1 : 6400

Tabelle I: Konzentrierung der HAV/Frhk-4/R-Suspension durch Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation.

4.2.2 Reinigungsverfahren

4.2.2.1 Saccharosegradient

Die Ergebnisse der ersten Zentrifugationsversuche mit pelletiertem Material zeigten, daß die Abtrennung unspezifischen Proteins vom HAV-haltigen Protein durch die Sedimentation in Saccharose effektiver war, als durch CsCl-Gradienten-Zentrifugation. Daher wurde die Saccharose-Sedimentations-Zentrifugation als erster Reinigungsschritt mit dem durch Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation konzentrierten Material gewählt.

Die Saccharosegradienten-Zentrifugation (Gradient wurde hergestellt aus 10%- und 30%iger Saccharoselösung) erfolgte 1 Stunde bei 4°C und 181 900g

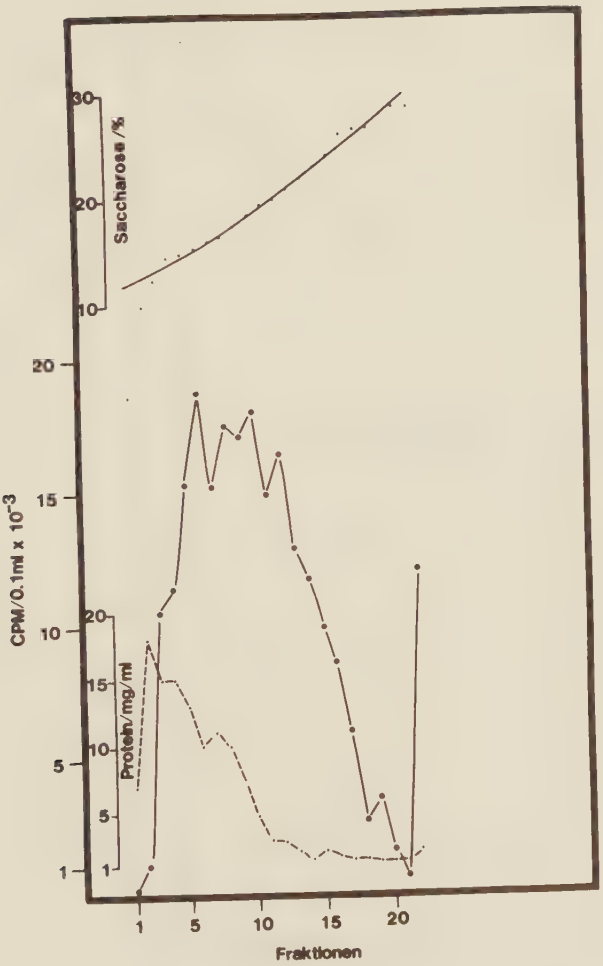

Abb.12: Saccharosegradientenzentrifugation der durch Ammoniumsulfatfällung und Ultrazentrifugation konzentrierten HAV/Frhk-4/R-Suspension.
Antigenität: ——•——
Proteinkonzentration: —•—•—
Saccharosekonzentration: ————

im SW 40 Ti Rotor. Von jeder der entnommenen 0,5ml-Fraktionen wurde die Saccharosekonzentration im Refraktometer und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Die Fraktionen wurden 1:50 verdünnt und deren Antigenität mit dem RIA gemessen. Durch die hohen Konzentrationen des HAV konnte kein scharf abgrenzbarer Antigenpeak ermittelt werden. Die nachweisbare Antigenität reichte vielmehr von Fraktion 5 bis 15 (Abb.12).

4.2.2.2 Caesiumchlorid-Gradient

Mit den Fraktionen des Saccharosegradienten wurden 4 Pools hergestellt:
1. Pool: Fraktion 5-7, 2. Pool: Fraktion 8-10, 3. Pool: Fraktion 11-13, 4. Pool: Fraktion 14-17. Von jedem Pool wurden jeweils 1,8ml auf einen Caesiumchlorid-Gradienten (hergestellt aus Lösungen mit den Dichten 1,11g/cm^3 und 1,47g/cm^3) aufgetragen. Die Zentrifugation wurde 18,5 Stunden bei 10^{o}C und 145 650g im SW 40 Ti Rotor durchgeführt. Nach der Zentrifugation war in allen Zentrifugen-Röhrchen eine gelbe Bande sichtbar, die am deutlichsten in jenem mit dem 1. Pool, am schwächsten in jenem mit dem 4. Pool ausgeprägt war. Es wurden dann jeweils 23 Fraktionen a 0,5ml abgenommen und deren Dichten im Refraktometer, sowie deren Proteinkonzentration nach Bradford ermittelt. Wie Abb.13a-d zeigt, erschienen in allen vier Gradienten zwei Antigenpeaks. Die Dichtewerte der Partikel der 1. Antigenitätspeaks lagen zwischen 1,185g/cm^3 und 1,23g/cm^3 und die der 2. Antigenitätspeaks zwischen 1,29g/cm^3 und 1,342g/cm^3. Die höchsten Proteinkonzentrationen wurden in den Fraktionen 13 und 14 gemessen. Dies entsprach der Lokalisation der gelben Bande. Beim 4. Pool betrug die Proteinkonzentration weniger als 0,1mg/ml.

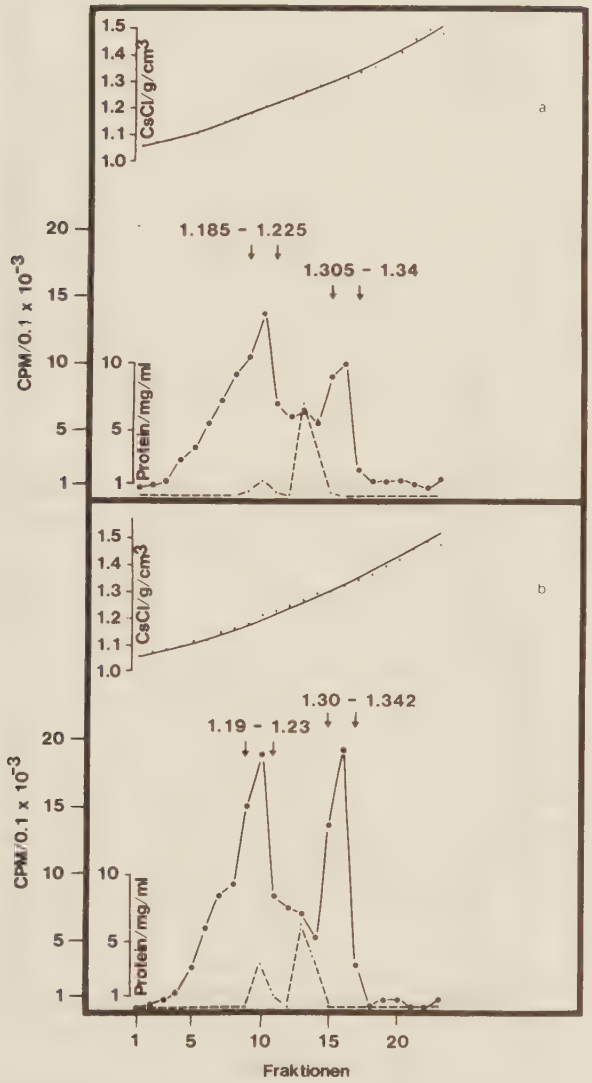

Abb.13: CsCl-Gradienten-Zentrifugation mit konzentriertem und durch Saccharosegradienten-Zentrifugation gereinigtem HAV/Frhk-4/R. Pool der Fraktionen 5-7 (a) und Fraktionen 8-10 (b) des Saccharosegradienten. Antigenität: ——●—— , Proteinkonzentration: -·-·- Dichte: ————

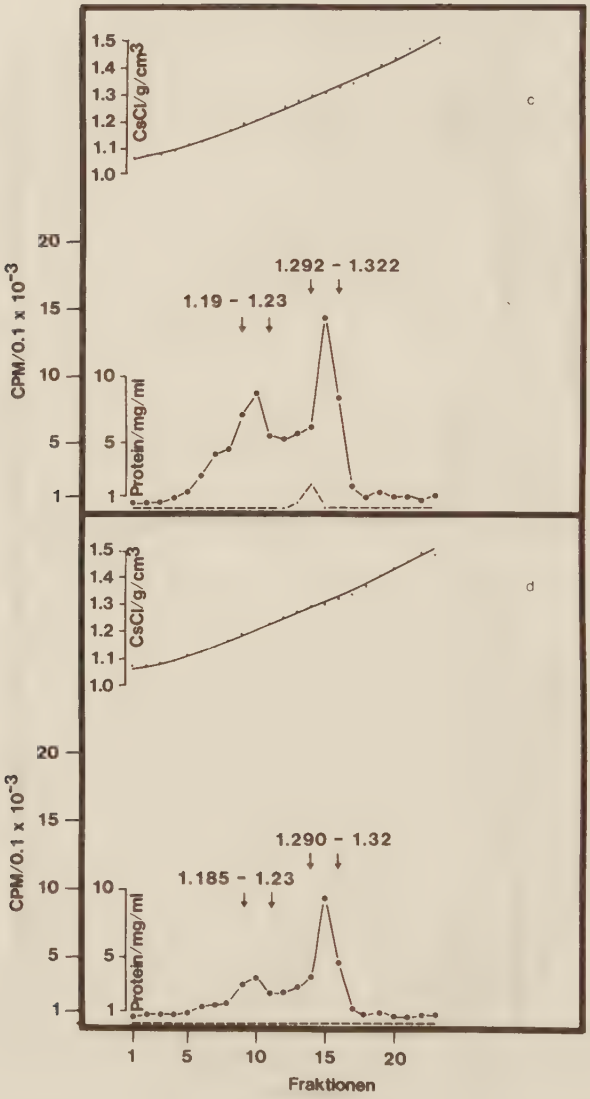

Abb.13: CsCl-Gradienten-Zentrifugation mit konzentriertem und durch Saccharosegradienten-Zentrifugation gereinigtem HAV/Frhk-4/R. Pool der Fraktionen 11-13 (c) und Fraktionen 14-17 (d) des Saccharosegradienten. Antigenität: ——•—— , Proteinkonzentration: —·—·— Dichte: ———

4.2.3 Darstellung des gereinigten Antigens

Durch elektronenmikroskopische Darstellung der gereinigten Antigenpeakfraktionen sollte ein Vergleich der Partikel des 1. und 2. Antigenitätspeaks des Caesiumchlorid-Gradienten ermöglicht werden.
Trotz verschiedener Dichte der Partikel konnten keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Größe und ihrer Labilität gegenüber Negativ-Kontrastierungsmittel (1% Phosphorwolframsäure) festgestellt werden (Abb.14). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proteinkonzentrations-Bestimmungen, die die höchsten Proteinkonzentrationen in den Fraktionen des 1. Pools und die geringsten Konzentrationen im 4. Pool nachwiesen, wurden elektronenoptisch die saubersten Partikel im 4. Pool (Abb.14C,D) gesehen.

4.2.4 Nachweis der Infektiosität der Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten

Mit den Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten des 1. und 4. Pools, die von 10^{-2} bis 10^{-8} austitriert worden waren, wurden Frhk-4/R Zellen beimpft. Nach 14 Tagen konnte die Antigenität der Zellüberstände mit dem RIA gemessen und nach Kärber die $TCID_{50}$ bestimmt werden.
Sowohl beim 1. Pool (Abb.15a), als auch beim 4. Pool Abb.15b), lag die Hauptinfektiosität bei den 1,30 - 1,34g/cm^3 dichten Partikeln, die eine $TCID_{50}$ von $10^{6,5}$ aufwiesen. Dagegen wurde der Titer der 1,185 - 1,23g/cm^3 dichten Partikel mit $10^{5,75}$ bestimmt.
Wie ein Vergleich mit den Peaks der Antigenität zeigt (vgl. Abb.13a und Abb.13b), konnte bereits in den Fraktionen Infektiosität nachgewiesen werden, in denen nur geringe Antigenität gemessen wurde. Dies wurde durch die hohe Sensitivität des Infektiositätstestes ermöglicht.

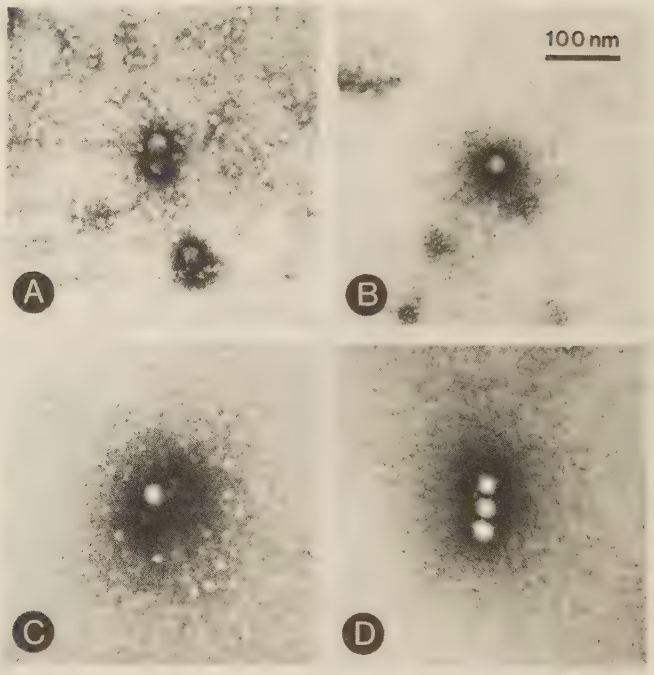

Abb.14: Elektronenmikroskopische Darstellung der Peakfraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten.
CsCl-Gradienten-Zentrifugation des 1. Saccharosegradienten-Pools: 1,21g/cm^3-Partikel (A) und 1,315g/cm^3-Partikel (B).
CsCl-Gradienten-Zentrifugation des 4. Saccharosegradienten-Pools: 1,21g/cm^3-Partikel (C) und 1,30g/cm^3-Partikel (D).

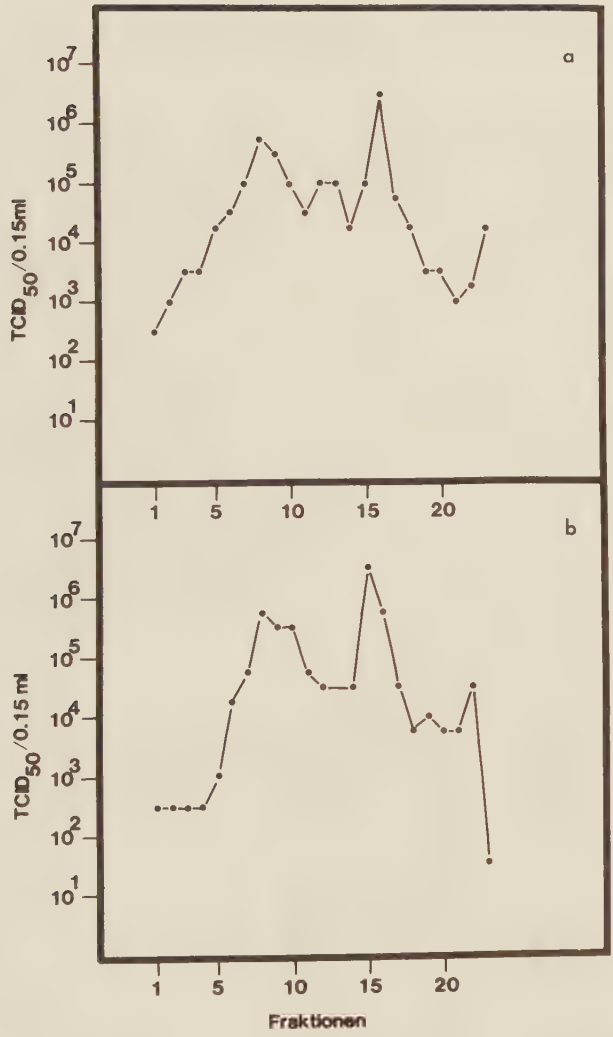

Abb.15: Bestimmung der Infektiosität der Fraktionen des Caesiumchlorid-Gradienten vom 1. Pool (Fraktionen 5 - 7) (a) und vom 4. Pool (Fraktionen 14 - 17) (b) des Saccharose-gradienten.

4.3 Darstellung von Bandenmuster eines Proteinstandards in Gelen unterschiedlicher Konzentration

Im folgenden Versuch sollte ein Gelsystem gefunden werden, in dem Proteine mit niedrigen Molekulargewichten (zwischen 96 000 und 14 000 Daltons) optimal getrennt werden. Vor allem Proteine mit Molekulargewichten kleiner 20 000 sollten eine deutliche Auftrennung erfahren. Es wurde daher ein 10%iges, 15%iges und ein Gradientengel von 8% bis 18% angefertigt. Vom Proteinstandard (LMW Calibration Kit, LKB) wurden jeweils 10 µl auf jedes Gel aufgetragen. Der Standard bestand aus folgenden Proteinen mit den zugehörigen Molekulargewichten: Phorphorylase b (94 000), Albumin (67 000), Ovalbumin (43 000), Carbonic Anhydrase (30 000), Trypsin Inhibitor (20 100), α-Lactalbumin (14 400).
Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele mit Silbernitrat gefärbt. Die unterschiedliche Distanz

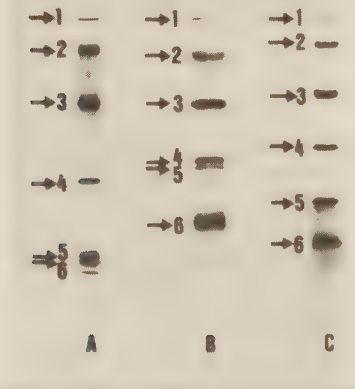

Abb.16: Bandenmuster eines Proteinstandards in 10%igem Gel (A), 15%igem Gel (B) und 8% - 18%igem Gradientengel (C).

der einzelnen Banden in jedem Gel ist der Abb.16 zu entnehmen. Die Auftrennung der Proteine im unteren Molekulargewichtsbereich (20 000-14 000) war im 10%igen Gel nicht möglich. Dagegen gelang sie im 15%igen Gel und im Gradientengel gut. Die Banden mit den Molekulargewichten 30 000 und 20 100 wurden nur im 15%igen Gel ungenügend getrennt. Eine optimale Auftrennung aller 6 Proteine konnte mit dem Gradientengel erreicht werden.

4.4 Bestimmung der Nachweisgrenze von Proteinen im Polyacrylamidgel mit verschiedenen Färbemethoden

Mit diesem Versuch sollte die minimale Proteinkonzentration ermittelt werden, die durch Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie und Silbernitrat, gerade noch sichtbar gemacht werden kann.

Dazu wurden die Proteine eines Standards (LMW Calibration Kit, LKB) in verschiedenen Konzentrationen in einem 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Färbung mit Coomassie und mit Silbernitrat konnte die Nachweisgrenze bestimmt werden.
Abb.17 oben stellt die Banden nach der Coomassie-Färbung dar. Die Konzentration von 0,187mg/ml, die bei der 1 : 32 Verdünnung vorlag, reichte gerade noch aus, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Dagegen konnten die Proteine mit der Silbernitratfärbung bis zu einer Verdünnung von 1 : 1024 dargestellt werden. Dies entsprach einer Protein-Gesamtkonzentation von 60ng/10µl, bzw. 0,006mg/ml (Abb.17 unten). Das Ergebnis verdeutlicht die hohe Empfindlichkeit der Silbernitratfärbung, die gegenüber der Coomassie-Färbung 100 mal sensitiver ist.

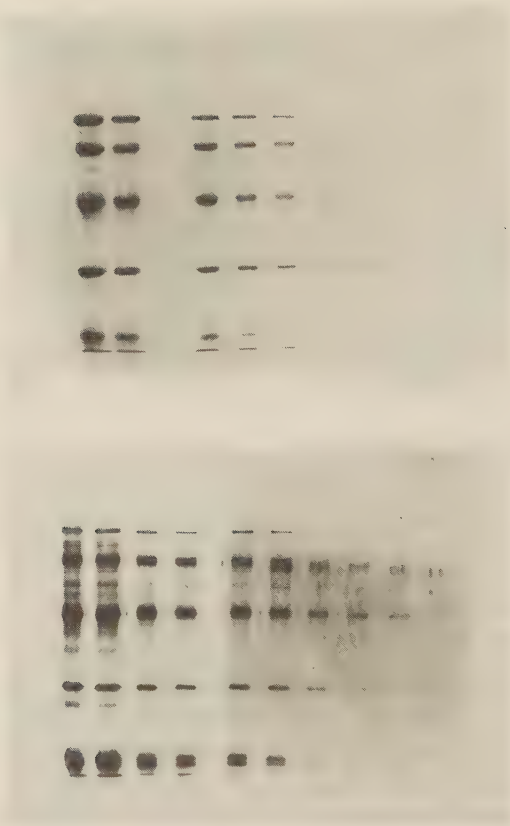

Abb.17: Vergleich der Nachweisgrenze von Proteinen mit Coomassie Färbung (oben) (Konzentrationen von links nach rechts: 120µg, 60µg, 30µg, 15µg, 7,5µg 3,75µg, 1,875µg, 0,938µg, 0,469µg) und Silbernitrat-Färbung (unten) (Konzentrationen von links nach rechts: 15µg, 7,5µg, 3,75µg, 1,875µg, 0,938µg, 0,469µg, 0,235µg, 0,118µg, 0,059µg, 0,029µg).

4.5 Immunpräzipitation der Antigenpeak-Fraktionen

Mit dem Ziel, weitere Reinigungseffekte zu erreichen, wurde eine Immunpräzipitation mit den Fraktionen des CsCl-Gradienten (vgl. Kap. 4.2.2.2) durchgeführt. Dazu wurden 800µl der Fraktionen mit den Partikeln der Dichte 1,185 - 1,215g/cm^3 gepoolt. Zur Hälfte des Pools (400µl) wurden 30µl IgG zugegeben, das aus dem Serum eines Hepatitis A-Patienten vor Erkrankungsbeginn (Präserum) abgenommen und isoliert worden war und einen Proteingehalt von 0,54mg/ml hatte (als Kontrolle). Die andere Hälfte des Pools wurde mit 10µl IgG versetzt, das aus dem Rekonvaleszentenserum des gleichen Patienten (Postserum) gewonnen worden war. Der Titer lag bei 1 : 5600 und der Proteingehalt betrug 1,5mg/ml (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen). Diesselben Ansätze wurden mit den Fraktionen der 1,30 - 1,325g/cm^3 dichten Partikel hergestellt. Die Ansätze inkubierten 2 Tage lang bei 4°C. Das Präzipitat wurde dann 2 Stunden bei 12 000g abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und die erfolgreiche Präzipitation durch den RIA überprüft. Die Präzipitate und das Sediment der Kontrollen wurden jeweils mit 50µl PBS aufgenommen. Die Proteine der Präzipitate, Sedimente und Überstände wurden auf einem 10%igen Polyacrylamidgel dargestellt. Es konnten jedoch im Vergleich mit den Banden des Prä- und Post-IgG keine zusätzlichen HAV-spezifischen Banden gefunden werden. Um die elektrophoretische Auftrennung zu verbessern, wurden die Proben auf ein Gradientengel aufgetragen. Die Immunpräzipitate wurden mit 1,19 - 1,22g/cm^3 und 1,28 - 1,32g/cm^3 dichten HAV Partikeln, die auf humanen Fibroblasten Zellen (HFS) gezüchtet worden waren, hergestellt (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen) entsprechend dem oben beschriebenen Verfahren.

4.5.1 Darstellung der Immunpräzipitate

a) Gelelektrophoretisch

Die elektrophoretische Auftrennung der Immunpräzipitate, der Kontrollen und des Post- und Prä-IgG wurden auf einem Gradientengel durchgeführt. Das Gel wurde mit Silbernitrat gefärbt.
Abb.18a stellt das Rekonvaleszenten-IgG dar, dessen Banden beim Immunpräzipitat mit den 1,19 - 1,22g/cm^3 (b) und dem der 1,28 - 1,32g/cm^3 (c) Partikel wieder erscheinen. Die Banden der Kontrolle (Sediment des mit Prä-IgG inkubierten HAV) (d) lassen sich mit den Banden des Prä-IgG (e) vergleichen. Die Silberfärbung wurde verhältnismäßig lange durchgeführt, damit sich die geringer konzentrierten Proteine, d.h. die Virusproteine darstellen lassen. Dadurch wurden jedoch überaus zahlreiche und teilweise auch stark angefärbte Banden sichtbar, die wahrscheinlich schwächere Banden überdeckten und damit auch die virusspezifischen Banden. Im niedermolekularen Bereich stellen sich nur sehr schwache Banden dar, deren Spezifität unklar bleibt.

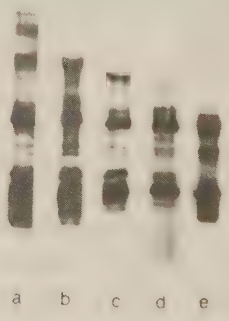

Abb.18: Polyacrylamidgelelektrophorese (Gradientengel) des Rekonvaleszenten-IgG (a), des Immunpräzipitates mit 1,19 - 1,22g/cm^3 Partikel (b) und 1,28 - 1,32g/cm^3 Partikel (c), der Kontrollen: Sediment des mit Prä-IgG inkubierten HAV (d), Prä-IgG (e).

b) Elektronenmikroskopisch

Das elektronenmikroskopische Bild (Abb.19) zeigt die Immunagglutinate der 1,185 - 1,21g/cm^3-Partikel, die vom Strahlenkranz der Antikörper umgeben sind.

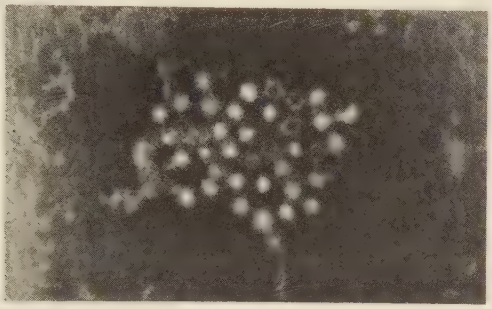

Abb.19: Immunagglutinate der 1,185 - 1,21g/cm^3 Partikel. Vergrößerung: 125 000fach.

4.6 Darstellung der Proteine des radioaktiv markierten Antigens

Durch die Markierung des gereinigten Hepatitis A-Virus mit ^{125}J sollte zusätzlich ein empfindlicher Nachweis virusspezifischer Proteine ermöglicht werden.
Zur Durchführung der Jodierung (vgl. Kap. 3.9) wurden jeweils 2,5µl der Fraktionen mit den 1,20 - 1,215g/cm^3 Partikeln des Caesiumchlorid-Gradienten (Fraktion 10 des 1., 2., 3. und 4. Pools) und je 2,5µl der Fraktionen mit den 1,30 - 1,325g/cm^3 Partikeln (Fraktion 16 aus dem 1. und 2. Pool, Fraktion 15 aus dem 3. und 4. Pool) gepoolt. Das freie, nicht gebundene Jod wurde durch eine Sephadex G 50-Säule abgetrennt und 10µl der 1ml-Fraktionen im Gamma-Counter gezählt. Dabei konnten 3 Peaks ermittelt werden (Abb.20). Alle Peakfraktionen wurden durch Disk-Elektrophorese in 10%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt.

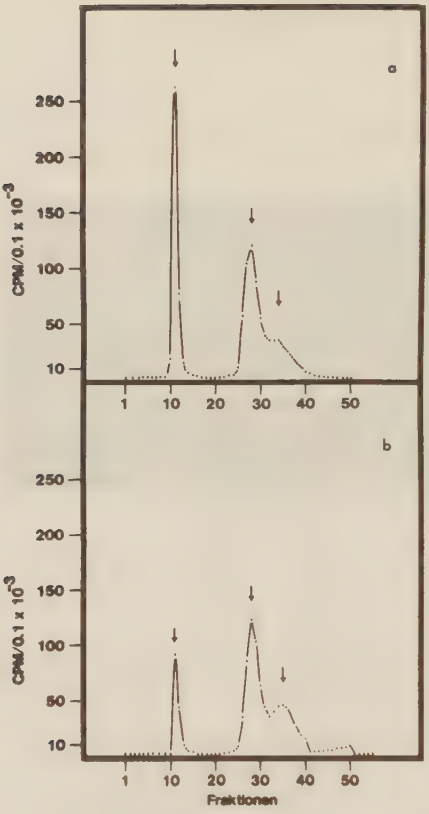

Abb.20: Abtrennung des ungebundenen ^{125}J vom jodierten Antigen durch eine Sephadex G 50-Säule. Linker Peak (Pfeil) entspricht dem jodierten Material,die beiden rechten Peaks (Pfeile) entsprechen dem ungebundenen Jod. Jodierung der 1,20 - 1.215g/cm^3 Partikel (a), der 1,30 - 1,325g/cm^3 Partikel (b) des konzentrierten und gereinigten HAV/Frhk-4/R.

4.6.1 Ausmessung des Gels im Gamma-Counter und Bestimmung der Molekulargewichte

Das Gel wurde entsprechend der Lokalisation der aufgetragenen Proben in 2mm Streifen geschnitten und die Counts jedes Streifens im Gamma-Counter gezählt.
Die ausgemessenen Gelstreifen des 1. Jodierungspeaks der 1,20 - 1,215g/cm^3 Partikel ergaben 8 Peaks (Abb.21a). Dagegen konnten in den Gelstreifen mit den Proben des 2. und 3. Jodierungspeaks nur im unteren Gelbereich Counts gemessen werden. Das zeigt, daß nur der 1. Jodierungspeak dem jodierten Material entsprach, während der 2. und 3. Peak durch freies Jod entstanden war. Die jodierten Proteine der 1,30 - 1,325g/cm^3 dichten HAV Partikel waren ebenfalls im Material des 1. Jodierungspeaks enthalten. Jedoch wurden in den Gelstreifen dieses 2. Antigenitätspeaks weniger Counts gemessen, als in denen des 1. Antigenitätspeaks (Abb.21b). Dies weist darauf hin, daß entweder die jodierte Proteinmenge zu gering war, um nach der elektrophoretischen Auftrennung genügend Counts zu messen, oder aber, daß diese Partikel weniger gut jodierbar waren, da die Jodierung unter identischen Bedingungen durchgeführt wurde.
Die Molekulargewichte der jodierten und elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte eines Proteinstandards, der im gleichen Gel elektrophoretisch aufgetrennt worden war, errechnet (vgl. Kap. 3.11).
Von den 1,20 - 1,215g/cm^3 Partikel (Abb.21a) wurden hochmolekulare Proteine mit 150kD, 135kD und 85kD ermittelt. Die meisten Counts wurden bei den 78kD- und 65kD-Banden gemessen, während die Proteine mit 41kD, 29kD und 16kD kleinere Peaks ergaben.
Die Molekulargewichte der 1,30 - 1,325g/cm^3 Partikel (Abb.21b) lagen vor allem im höhermolekularen Bereich

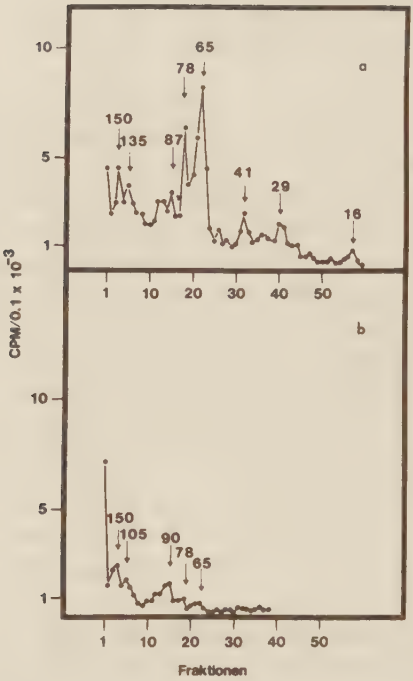

Abb.21: Ausmessung der Gelstreifen im Gamma-Counter. Elektrophoretische Auftrennung von 1,20 - 1,215g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R Partikel (a) und von 1,30 - 1,325g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R Partikel (b) mit Angabe der Molekulargewichte (in kD).

(150kD, 105kD, 90kD). Außerdem konnten Proteine mit 78kD und 65kD identifiziert werden, jedoch reichten die Counts der jodierten Proteine im unteren Molekulargewichtsbereich nicht aus, damit deutliche Peaks ausgebildet und deren zugehörigen Molekulargewichte bestimmt werden konnten.

In weiteren Versuchen wurde HAV, das auf menschlichen Fibroblasten (HFS) gezüchtet worden war, mit Ammoniumsulfat gefällt, denselben Reinigungs- und Konzentrierungsverfahren unterworfen und jodiert (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen). Der 2. Antigenitätspeak mit den 1,296g/cm^3 dichten Partikel wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die Gelstreifen im Gamma-Counter gemessen (Abb.22). Von den Peaks, die sich aus den gemessenen Counts ergaben, wurden ebenfalls die Molekulargewichte errechnet. Neben einem hochmolekularen Protein mit 180kD wurden Proteine mit 105kD und 90kD ermittelt, die mit den höchsten Peaks korrelierten. Bei den 65kD, 52kD und 16kD-Banden wurden geringere Counts gemessen, während das Protein mit 28kD wieder einen deutlichen Peak ergab.

4.6.2 Autoradiographie

Unter identischen Bedingungen wurden diesselben jodierten Proben, die zur Ausmessung im Gamma-Counter bestimmt waren (vgl. Kap. 4.6.1) in einem 2. Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Gel wurde zur Autoradiographie verwendet. Die Exposition des Röntgenfilms erfolgte 4 Tage lang bei 4°C in einer Röntgenfilm-Kassette. Im Autoradiogramm (Abb.23) wurde nur der 1. Peak-Pool abgebildet. Dies beweist die Annahme, daß die jodierte Proteinmenge des 2. Peak-Pools zu gering war, bzw. sich diese Partikel weniger gut jodieren ließen und daher auch im Autoradiogramm nicht sichtbar werden konnten (vgl. Kap. 4.6.1).
Mit den HAV Proben, die auf HFS Zellen gezüchtet worden waren (vgl. Kap. 4.6.1), wurde ebenfalls ein

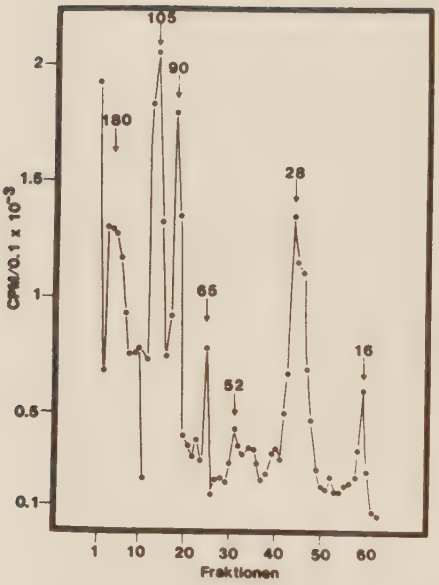

Abb.22: Ausmessung der Gelstreifen im Gamma-Counter nach elektrophoretischer Auftrennung von 1,296g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel mit Angabe der Molekulargewichte (in kD).

Autoradiogramm erstellt. Abb.24 zeigt die Proteine der 1,208g/cm^3 und der 1,296g/cm^3 Partikel des Caesium-chlorid-Gradienten.
Inwieweit die durch Autoradiographie dargestellten Proteine mit denen übereinstimmen, die durch Ausmessung der Gelstreifen im Gamma-Counter ermittelt worden waren, wurde durch die Bestimmung der Molekulargewichte festgestellt.

Abb.23: Autoradiogramm der 1,20 - 1,215g/cm^3 dichten HAV/Frhk-4/R-Partikel. Angabe der Molekulargewichte in kD.

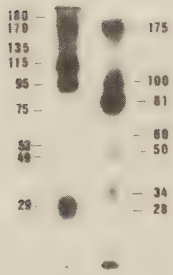

Abb.24: Autoradiogramm der 1,296g/cm^3 (links) und der 1,208g/cm^3 dichten HAV/HFS-Partikel (rechts). Angabe der Molekulargewichte in kD.

4.6.3 Bestimmung der Molekulargewichte

Von den Autoradiogrammen (vgl. Kap. 4.6.2) wurden die Molekulargewichte näherungsweise mit Hilfe einer Geraden bestimmt, die durch die bekannten Molekulargewichte und die berechneten R_f-Werte eines definierten Proteinstandards gelegt wurde.
Im Autoradiogramm der 1,20 - 1,215g/cm^3 dichten HAV-Partikel (Abb.23), die auf Frhk-4/R Zellen gezüchtet worden waren, ließen sich die meisten Banden im oberen Molekulargewichtsbereich zwischen 125kD und 64kD darstellen, wobei die 112kD-, 81kD- und 64kD-Banden am deutlichsten sichtbar und die 125kD- und 95kD-Banden nur schwach ausgeprägt waren. Im unteren Molekulargewichtsbereich wurden schwache Banden bei 38kD und 17kD, sowie eine breite Bande bei 27kD abgebildet.
Ein Vergleich der Banden mit den Peaks der ausgemessenen Gelstreifen im Gamma-Counter ergibt eine deutliche Übereinstimmung (vgl. Abb.21a). Die Molekulargewichte der beiden herausragenden Peaks, die mit 78kD und 65kD bestimmt wurden, korrelieren mit den 81kD- und 64kD-Banden im Autoradiogramm. Ebenso entsprechen die 41kD-, 29kD- und 16kD-Peaks den 38kD-, 27kD- und 17kD-Banden.
Abb.24 zeigt die Autoradiogramme der auf HFS Zellen vermehrten 1,208g/cm^3 und 1,296g/cm^3 dichten HAV Partikel. Die meisten Proteine der 1,296g/cm^3 Partikel bildeten Banden im Bereich zwischen 180kD bis 95kD - schwache Banden ließen sich bei 75kD, 53kD und 49kD erkennen. Bei 29kD wurde wieder eine breite Bande abgebildet. Bei den 1,208g/cm^3 dichten HAV Partikeln waren weniger Proteine mit hohen Molekulargewichten (175kD, 100kD, 81kD) vertreten als bei den 1,296g/cm^3 Partikeln. Die 1,208g/cm^3 Partikel bestanden außerdem aus Proteinen, die schwächere Banden ergaben und deren

zugehörige Molekulargewichte bei 60kD, 50kD, 34kD und 28kD lagen. Auch bei den 1,296g/cm^3 Partikeln korrelierten die Banden des Autoradiogramms weitgehend mit den Peaks der ausgemessenen Gelstreifen (vgl. Abb.22). Das 180kD-Protein wurde in beiden Fällen dargestellt. Die 115kD- und 95kD-Banden entsprechen den Peaks der 105kD und 90kD Proteine. Die 53kD- und 29kD-Banden stimmen mit dem 52kD- und 28kD-Peak überein. Im Gegensatz zum ausgemessenen Gelstreifen wurde jedoch kein Protein mit 16kD gefunden.

In allen beschriebenen Autoradiogrammen wurden, übereinstimmend mit den Ergebnissen der ausgemessenen Gelstreifen im Gamma-Counter, die meisten Proteine im oberen Molekulargewichtsbereich dargestellt. Die Proteine, die im niedermolekularen Bereich mit Hilfe beider Methoden identifiziert wurden, lagen im Bestimmungsfeld der für Stuhlvirus publizierten Strukturproteine (34kD, 27-28kD, 29kD, 16-17kD).

4.7 Bestimmung der Sedimentationskonstanten des infektiösen Hepatitis A-Virus

Da die restlichen noch zur Verfügung stehenden Mengen an konzentriertem HAV für die Bestimmung der Sedimentationskonstanten nicht mehr ausreichten, wurde anstelle des an Frhk-4/R-Zellen adaptierten, das an HFS-Zellen adaptierte HAV verwendet (zur Verfügung gestellt von Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig, Tübingen). Die Dichte der beiden HAV-Pools betrug 1,19 - 1,22g/cm^3 und 1,28 - 1,32g/cm^3.
Nach der unter 3,9 beschriebenen Methode wurden drei Referenzproben mit bekannten S-Werten (TMV, Polio Virus, Haemocyanin) zusammen mit jeweils einem HAV-Pool durch

einen Saccharosegradienten zentrifugiert. Durch die gleichzeitige Zentrifugation in einem Zentrifugenröhrchen wurden präzise Ergebnisse erreicht. Anschließend wurde in den beiden Zentrifugenröhrchen, die jeweils einen HAV-Pool enthielten, die Lokalisation des Tabak Mosaik Virus und des Haemocyanins im Streulicht ermittelt. Die sichtbaren Banden wurden am Röhrchen markiert. Das Haemocyanin wurde zusätzlich durch Bestimmung der Proteinkonzentrationen der entnommenen 0,4ml-Fraktionen identifiziert. Die Lokalisation des Polio Virus konnte nach Beimpfen von HFS Zellen anhand des cytopathischen Effektes festgestellt werden.
Abb.25A und C stellen die ermittelten Lokalisationen der Markerproteine dar. Die Bande des gleichzeitig zentrifugierten HAV-Pools wurde mit dem RIA identifiziert (Abb.25B und D). Der Antigenitätspeak der 1,19 - 1,22g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel wurde in Fraktion 10 (Abb.25B), Haemocyanin in Fraktion 12, Polio Virus in Fraktion 20 und Tabak Mosaik Virus in Fraktion 23 (Abb.25A) gefunden. Die 1,28 - 1,32g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel waren in Fraktion 17 lokalisiert (Abb.25D) und die Markerproteine in Fraktion 12 (Haemocyanin), Fraktion 19 (Polio Virus) und Fraktion 22 (Tabak Mosaik Virus) (Abb.25C).
Die Gerade, die sich durch Auftragen der gemessenen Abstände der Markerproteine vom Röhrchenende gegen die bekannten S-Werte ergab, zeigt Abb.26. Durch Ablesen an der Geraden wurde die Svedbergkonstante der 1,19 -1,22g/cm^3 Partikel mit 76s und die der 1,28 - 1,32g/cm^3 Partikel mit 150s bestimmt (Abb.25).

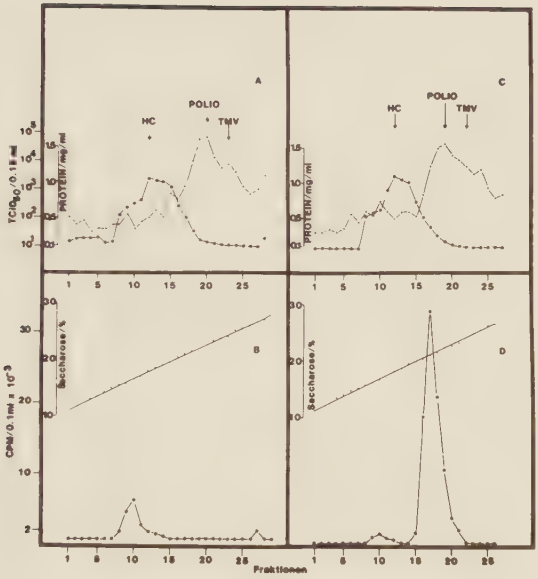

Abb.25: S-Wert-Bestimmung der 1,19 - 1,22g/cm^3 und 1,28 - 1,32g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel. Bestimmung der Lokalisation der Markerproteine: Polio Virus durch die $TCID_{50}$, Haemocyanin (HC) durch Proteinbestimmung und ebenfalls wie Tabak Mosaik Virus (TMV) durch Markierung der sichtbaren Bande (A, C).
Bestimmung der Lokalisation der 1,19 - 1,22g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel (B) durch Antigenitätsnachweis mit dem RIA, im Vergleich mit den unter identischen Bedingungen zentrifugierten Referenzproben (A) und der 1,28 - 1,32g/cm^3 dichten HAV/HFS Partikel (D) mit den zugehörigen Referenzproben (C).

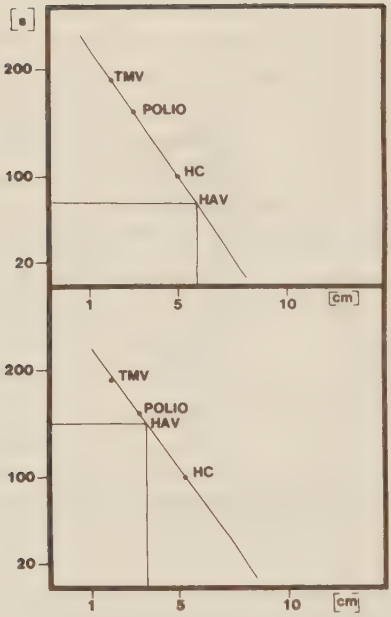

Abb.26: Bestimmung der Sedimentationskonstanten von HAV/HFS durch Vergleich mit den S-Werten von Tabak Mosaik Virus (TMV), Polio Virus und Haemocyanin (HC).
Oben: 1,19 - 1,22g/cm^3 dichte HAV/HFS Partikel.
Unten: 1,28 - 1,32g/cm^3 dichte HAV/HFS Partikel.

Es wurde ein weiterer Sedimentationslauf mit 1,22g/cm^3 und 1,325g/cm^3 dichten HAV-Partikeln durchgeführt und deren S-Wert mit 82s und 144s bestimmt. Anschließend wurden die Fraktionen des Sedimentationslaufs auf Infektiosität getestet.

Dazu wurden HFS Zellen mit den bis 10^{-8} austitrierten Fraktionen beimpft. Nach 3 Wochen wurden die Zellen

dreimal eingefroren und aufgetaut - zur Freisetzung des Virus - und anschließend 100µl des Zellüberstands mit dem RIA auf Antigenität getestet. Die $TCID_{50}$ wurde nach Kärber errechnet.
Für die 1,325g/cm^3 Partikel ergab sich ein Infektiositätspeak, der mit dem der Antigenität korrelierte. Der Titer wurde mit $10^{4,125}$ bestimmt. Dagegen konnte bei den 1,22g/cm^3 und 82s Partikel keine Infektiosität nachgewiesen werden, die im Bereich des Antigenitätspeaks lag. Geringe Infektiosität wurde jedoch in den Fraktionen bestimmt, die mit dem Antigenitätspeak der 144s Partikel übereinstimmten.

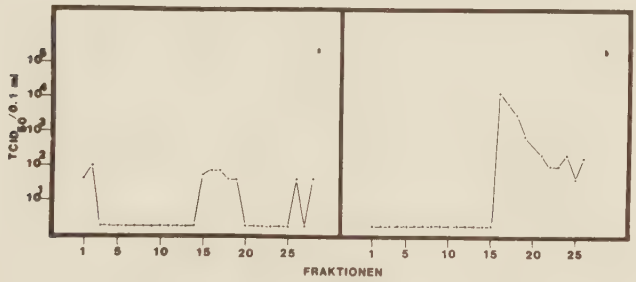

Abb.27: Bestimmung der Infektiosität der Fraktionen des Sedimentationslaufs mit 1,22g/cm^3 (a) und 1,325g/cm^3 (b) HAV/HFS Partikel.

5. Diskussion

Die Konzentrierungsmöglichkeiten des auf Frhk-4/R Zellen vermehrten Hepatitis A-Virus wurden anhand zweier Verfahren demonstriert:
1. Pelletieren des Antigens durch mehrmalige Ultrazentrifugationen und
2. Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat und nachfolgenden Ultrazentrifugationen.
Letztere Methode erwies sich als weniger zeitaufwendig, sodaß größere Zellüberstand-Volumina in kürzerer Zeit konzentriert werden konnten, als dies durch Ultrazentrifugationen allein möglich war. Der Nachteil der Ultrazentrifugationen bestand darin, daß nach jeder weiteren Zentrifugation größere Mengen von Antigen im Überstand blieben und sich nicht pelletieren ließen. Vermutlich handelte es sich dabei um Bruchstücke, die durch den Einfluß der Zentrifugationen entstanden waren und deren Sedimentationsverhalten sich gegenüber den intakten Partikeln verändert hatte.
Die Konzentrierung des Antigens wurde durch vergleichende Verdünnungsreihen mit dem RIA nachgewiesen.
Durch Zentrifugation über einen Saccharosegradienten wurde eine weitere Reinigung der HAV-Suspension von unspezifischen Proteinen erreicht. Die anschließende isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation mit CsCl zeigte bei der konzentrierten Virussuspension zwei Antigenitätspeaks im Bereich der Dichte 1,165 - 1,215g/cm^3 und 1,255 - 1,35g/cm^3. Die Partikel der Ammoniumsulfatgefällten und über einen Saccharosegradienten gereinigten Virussuspension bandeten im Bereich zwischen 1,185 - 1,23g/cm^3 und 1,29 - 1,342g/cm^3. Demnach stimmten die Dichtewerte der Partikel, die unterschiedlichen Konzentrierungsverfahren unterworfen worden waren, überein. Die 1,30 - 1,325g/cm^3 dichten Partikel des Hauptpeaks standen im Einklang mit dem von Flehmig 1981 (17) publizierten

Dichtewert von 1,32g/cm^3 des ebenfalls auf Frhk-4/R Zellen vermehrten Virus. In der zitierten Arbeit wurden zusätzlich zwei kleinere Peaks mit geringeren Dichten von 1,15g/cm^3 und 1,205g/cm^3 gefunden und in einem anderen Lauf mit demselben Virus 1,26g/cm^3 und 1,415g/cm^3 dichte Partikel. Außer dem zuletztgenannten Dichtewert konnten alle anderen Daten in dieser Arbeit bestätigt werden. Siegl und Mitarbeiter (46) untersuchten HAV aus menschlichen Stuhlproben (19) und fanden kleine Antigenpeaks im Bereich der Dichte von 1,38 - 1,44g/cm^3 und 1,305g/cm^3, sowie einen Hauptpeak zwischen 1,31g/cm^3 und 1,35g/cm^3. Für das Stuhlvirus wurde die Hauptbande übereinstimmend mit 1,34g/cm^3 angegeben, aber auch immer eine kleinere Bande mit 1,40 - 1,44g/cm^3 (3, 40, 46). Beim Polio Virus wurde von Mapoles (31) das Vorkommen der 1,4g/cm^3 Partikel dadurch erklärt, daß das defekte Kapsid für Caesium-Ionen permeabel ist und folglich Caesium-Ionen an das RNA-Genom gebunden werden.
Da in der vorliegenden Arbeit für das Zellkulturvirus keine Partikel hoher Dichte (>1,35g/cm^3) gefunden wurden, und außerdem die Dichte des Hauptpeaks bei 1,32g/cm^3 lag, muß ein Dichteunterschied zwischen Zellkulturvirus und dem Stuhlvirus angenommen werden. Die Ursache für die Dichtedifferenz der Hauptbande von Stuhl- und Zellkulturvirus ist bisher noch ungeklärt geblieben und bedarf weiterer Untersuchungen. Möglicherweise ist die Ursache hierfür die Anlagerung von Proteinen oder Lipiden aus den Zellen. Elektronenmikroskopische Hinweise für eine Anlagerung von Substanzen an das HAV konnten in Experimenten von Hentschel gefunden werden (persönliche Mitteilung).

Elektronenoptisch stellten sich die unterschiedlich dichten HAV Partikel als 27nm Partikel dar, die sich in ihrer Morphologie nicht unterschieden. Leere Partikel, wie dies von Schulman und Mitarbeiter (43) bei den 1,29g/cm^3 dichten Partikeln aus Stuhlproben beschrieben wurde, und wie es ebenfalls für die 1,29g/cm^3 und 75s Komponente der Enteroviren charakteristisch ist,

konnten von uns nicht gefunden werden. Vielmehr überwogen die vollen und intakten HAV-Partikel in beiden Dichtepeaks.

Experimente mit Hepatitis A-Viren, die in menschlichen Fibroblasten-Kulturen gezüchtet worden waren, zeigten, daß sich dieses HAV identisch im CsCl-Gradienten und im Saccharosegradienten verhielt wie das Frhk-4/R-Zell-produzierte (Flehmig, persönliche Mitteilung). Exakte S-Wert-Bestimmungen wurden daher mit diesem Virus durchgeführt, das in größeren Mengen vorhanden war. Die Sedimentationskonstanten des HAV wurden mit Markerproteinen, deren S-Werte definiert waren, bestimmt. Als Marker wurden Polio Virus, Tabak Mosaik Virus und Haemocyanin verwendet. Ein präziser Vergleich der Sedimentation des HAV mit den Sedimentationen der Markerproteine wurde durch die gleichzeitige Zentrifugation dieser Substanzen in einem Zentrifugenröhrchen erreicht. Nach der Saccharosegradienten-Zentrifugation wurden die Banden des Haemocyanins und des Tabak Mosaik Virus im Streulicht ermittelt und zusätzlich die Lokalisation des Haemocyanins durch eine Proteinbestimmung festgestellt. Die Fraktion, welche die Bande des Polio Virus enthielt, wurde nach Beimpfen von menschlichen Fibroblasten anhand des cytopathischen Effektes identifiziert. Die gemessenen Abstände der Standorte der jeweiligen Referenzproben vom Röhrchenende, die gegen die bekannten S-Werte aufgezeichnet wurden, ergaben eine Gerade. Der S-Wert des HAV konnte direkt aus dieser Geraden abgelesen werden, nachdem die Bande des HAV mit dem RIA bestimmt worden war.
Die S-Wert-Bestimmungen ergaben für die 1,19 - 1,22g/cm^3 dichten HAV-Partikel 76s und für die 1,28 - 1,32g/cm^3 dichten Partikel 150s. Diese Ergebnisse stimmen mit den Angaben weitgehend überein, die Siegl (45) für das aus Stuhlproben isolierte Hepatitis A-Virus publizierte: die 1,332g/cm^3 dichten HAV-Partikel sedimentierten bei 156 ± 2s. Im Saccharosegradient fand Siegl außerdem

noch 74s und 20-50s Komponenten. Die zuletztgenannten Antigene konnten in den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, die kurz nach der Konzentrierung des Antigens durchgeführt wurden, nicht identifiziert werden. Die HAV-Suspension jedoch, die bereits einige Monate aufbewahrt worden war, änderte ihr Sedimentationsverhalten: Die 1,2g/cm^3 Partikel zerfielen zusätzlich in eine ca. 40s und 10s Komponente und die 1,3g/cm^3 Partikel zusätzlich in eine ca. 90s und ca. 40s Komponente. Es ist anzunehmen, daß die Ursache dieser Veränderungen mit dem Zerfall des Virus zusammenhängt. Auch Siegl beschrieb 1978 (46) solche Sedimentationskonstanten für Hepatitis A-Stuhlvirus: Die 1,34g/cm^3 Partikel, deren Hauptpeak bei 160s lag, ergaben zwei zusätzliche, kleinere Peaks bei ca. 100s und ca. 50s. Die 1,30g/cm^3 Partikel bildeten neben dem 160s Peak einen breiten, unregelmäßigen Peak zwischen 50s - 90s.

Die meisten nukleinsäurehaltigen Partikel fand Siegl in der 1,332g/cm^3 Fraktion, von denen man daher annehmen konnte, daß sie die infektiösen Virionen repräsentieren (45). Ein weiterer Beweis für diese Annahme konnte allerdings in der Arbeit von Siegl nicht erbracht werden. Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten erstmals durch die Titrationen der HAV Partikel auf Zellkulturen, welche der verschieden dichten Partikel mit der Infektiosität korrelierten. Die 1,29 - 1,34g/cm^3 Partikel wiesen einen hohen Infektiositätstiter von $10^{6,5}$, bzw. $10^{7,25}$ auf. Ebenfalls infektiös waren die 1,185 - 1,23g/cm^3 Partikel, deren Titer allerdings mit $10^{5,7}$, bzw. $10^{4,5}$ niedriger war, als derjenige der dichteren Partikel. Ein Vergleich mit den Enteroviren, denen das HAV am ehesten zugeordnet werden kann, zeigt, daß bei diesen außer den 1,34g/cm^3 dichten Komponenten keine anderen infektiösen Partikel existieren: Die 75s Partikel enthalten keine RNA, während die 130s - 150s Partikel (Provirionen) zwar RNA ent-

halten, jedoch nicht infektiös sind (42, 48). Die Schlußfolgerung dieser Befunde ist, daß auch bezüglich der Infektiosität der verschieden dichten HAV Partikel, Unterschiede zwischen den Enteroviren und den HA-Viren bestehen. Welcher Natur diese Unterschiede sind, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Nach den S-Wert-Bestimmungen der verschieden dichten HAV Partikel, wurde die Infektiosität der Fraktionen des Sedimentationslaufs bestimmt. Damit wurde zum ersten Mal die Infektiosität der unterschiedlich sedimentierenden Hepatitis A-Partikel, die auf menschlichen Fibroblasten vermehrt worden waren, untersucht.

Die Infektiositätsbestimmung ergab für die 144s Partikel einen Peak, der mit dem der Antigenität korrelierte; dagegen waren die 82s Partikel entweder nicht infektiös, oder ihr Titer war $<10^1$. Die nicht meßbare Infektiosität der 82s Partikel könnte mit dem Zerfall des Virus zusammenhängen, der durch die Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum verursacht wurde. Spekulativ könnte auch angenommen werden, daß die leichten Partikel keine RNA enthalten, bzw. aus inkompletten Anteilen bestehen und daher nicht infektiös sind. Die in vorangegangenen Versuchen mit konzentriertem und gereinigtem HAV/Frhk-4/R und HAV/HFS nachgewiesene Infektiosität der Partikel mit geringer Dichte wäre demnach durch Anteile, bzw. Verunreinigungen aus den infektiösen Partikel hoher Dichte zu erklären. Durch den Sedimentationslauf, der ein zusätzliches Reinigungsverfahren darstellt, könnten diese Anteile eliminiert worden sein. Weitere Versuche sind zur Klärung dieser Befunde notwendig.

Mit dem gereinigten Hepatitis A-Virus wurden Polyacrylamidgelelektrophoresen durchgeführt und damit die Darstellung der Proteine dieser Partikel versucht. Die gering konzentrierten Proteine des HAV konnten

jedoch nur sichtbar gemacht werden, wenn die Polyacrylamidgele mit Silbernitrat gefärbt wurden. Mit dieser Färbemethode ließen sich noch Proteinkonzentrationen von ca. 60ng/10µl nachweisen. Diese Methode ist demnach 100mal empfindlicher als die Coomassie Färbung, wird allerdings, entgegen der Aussage verschiedener Autoren (35, 49), durch Autoradiographie übertroffen, wie in Versuchen dieser Arbeit festgestellt werden konnte.
Durch die Sensitivität der Silberfärbung zeigte es sich, daß neben den Hepatitis A-Virusproteinen noch andere Proteine in den gereinigten Fraktionen enthalten waren. In den Gelen wurden mit dieser Färbemethode relativ viele Banden dargestellt, die sich möglicherweise auch gegenseitig verdeckten.
Mit den dargestellten Reinigungsverfahren konnten in den HAV-haltigen Fraktionen Proteinkonzentrationen erreicht werden, die unter 0,01mg/ml lagen. Jedoch war der Anteil der Virusproteine an der Gesamtproteinkonzentration der entsprechenden Fraktionen gering. Diese Annahme ließ sich durch Immunpräzipitationen bestätigen, durch die die nicht HAV-spezifischen Proteine eliminiert werden konnten. Im Gel sollten dann nur noch Proteine des IgG aus Rekonvaleszentenserum und die Virusproteine sichtbar werden. Es konnten jedoch nur die spezifischen Proteine des Rekonvaleszenten-IgG nachgewiesen werden. Zusätzliche Banden, die den Virusproteinen entsprechen müßten, waren nicht zu identifizieren. Es gibt dafür vier mögliche Erklärungen:
1. Die gering konzentrierten Virusproteine ließen sich selbst mit der Silberfärbung nur schwach anfärben und wurden von den intensiv gefärbten Banden des Rekonvaleszenten-IgG verdeckt,
2. Die eingesetzte Virusproteinkonzentration lag unter der Nachweisgrenze,

3. Die Behandlung des Virus vor dem Auftragen auf das Gel genügte nicht, um es vollständig zu dissoziieren,
4. Es müßte eine andere Gelzusammensetzung gewählt werden, damit die Proteinstrukturen ausreichend zerstört und Aggregationen verhindert werden.

Die Publikationen von Coulepis und Mitarbeiter (5, 6) lassen keine Rückschlüsse auf eine für das HAV speziell ausgearbeitete Vorgehensweise bezüglich der Darstellung der Virusproteine zu. Dagegen ließ sich bei Tratschin und Mitarbeiter (50) entnehmen, daß aufwendige experimentelle Bedingungen und Variationen verschiedener Parameter notwendig waren, damit schließlich ein eindeutiger Nachweis der Virusproteine erbracht werden konnte. Ihm gelang der Virusproteinnachweis mit Gelelektrophorese in einem kontinuierlichen Phosphatpuffersystem mit 8M Harnstoff. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit nach derselben Methode verfahren wurde, konnten seine Ergebnisse nicht bestätigt werden. Allerdings muß darauf hingewiesen werden, daß sowohl Coulepis als auch Tratschin mit HAV experimentierten, das aus menschlichem Stuhl isoliert und nicht in vitro in Zellkulturen vermehrt worden war.

Da die Silberfärbung keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Proteinzusammensetzung erbrachte, wurden die gereinigten HAV Partikel mit ^{125}J markiert und erneut im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Banden der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine des jodierten Antigens wurden im Autoradiogramm dargestellt. Zusätzlich wurden die Gelabschnitte mit den jodierten Proben in Streifen geschnitten und im Gamma-Counter ausgemessen. Mit beiden Methoden ließen sich 7-9 Proteine darstellen, deren Molekulargewichte dann bestimmt wurden. Dabei ergaben sich übereinstimmende Ergebnisse: Die Proteine, die im Autoradiogramm die intensivsten Banden und deren Gelstreifen die höchsten Counts ergaben, lagen

im höhermolekularen Bereich zwischen 180kD und 70kD. Geringer konzentrierte Proteine mit schwächeren Banden und weniger hohen Counts wurden im niedermolekularen Bereich mit den Molekulargewichten von 65kD-50kD, 41kD-38kD, 34kD, 29kD-27kD und 17kD-16kD gefunden. Die Molekulargewichte der Virusproteine des aus Stuhl isolierten Hepatitis A-Virus, die von Coulepis und Mitarbeiter (5, 6) und Tratschin und Mitarbeiter (50) publiziert worden waren, wurden mit 24kD-31kD (VP1), 26kD (VP2), 21kD-22kD (VP3) und 9kD-14kD (VP4) angegeben. Außer einem Protein mit 40kD, das als Vorstufe von VP2 und VP4 gilt, wurden keine höhermolekularen Anteile beschrieben.
Gerlich und Frösner (26) bestimmten die Molekulargewichte der Hepatitis A-Strukturproteine von Viren, die auf Leberzell-Kulturen gezüchtet worden waren. Die Molekulargewichte dieses Virus lagen bei 33kD (VP1), 29kD (VP2) und 28kD (VP3), wobei das von Coulepis und Tratschin beschriebene 4. Virusprotein nicht nachgewiesen wurde.
Die Molekulargewichte der Virusproteine, die von den oben genannten Autoren publiziert wurden, liegen im Bereich der in dieser Arbeit gefundenen Werte. Die Spezifität der Proteine mit Molekulargewichten über 40kD, die sowohl in den Autoradiogrammen, als auch in den ausgemessenen Gelstreifen gezeigt wurden, muß in weiteren Versuchen geklärt werden.

Da es sich bei diesen hochmolekularen Anteilen möglicherweise um nicht HAV-spezifische Proteine handeln könnte, wurde vor der Gelelektrophorese versucht, das jodierte Antigen mit spezifischem Anti-HAV-IgG zu präzipitieren, wodurch unspezifische Proteine eliminiert werden sollten. Das jodierte Antigen war durch das Anti-HAV-IgG jedoch nicht mehr präzipitierbar, vermutlich war die Antigenstruktur durch die Jodierung zerstört worden.

Auch Feinstone wies 1978 (14) darauf hin, daß eine Immunpräzipitation mit ^{125}J-HAV nicht möglich wäre. Jedoch berichteten Gerlich und Frösner 1983 (26), daß unter den von ihnen gewählten Bedingungen eine Markierung des Oberflächen-Antigens möglich ist. Ihnen gelang ebenso wie Coulepis und Mitarbeiter (5) die Immunpräzipitation mit markiertem HAV.

Die Darstellung der Hepatitis A-virusspezifischen Proteine des auf Zellkulturen produzierten HAV zeigt, daß im Vergleich mit publizierten Daten, Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten gefunden werden konnten. Das Problem, ausschließlich die Proteine des Hepatitis A-Virus darzustellen und keine anderen Proteine, die wahrscheinlich zellulärer Herkunft waren, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig gelöst werden. Dazu bedarf es weiterer Kenntnisse über die Eigenschaften des Virus, und zusätzliche Versuche mit verschiedenen Jodierungsmethoden und Gelsystemen sind notwendig. Schließlich, und dies ist das zu lösende Hauptproblem, sollte die Virusproteinkonzentration durch weitere Konzentrierungsverfahren so erhöht werden, daß mit den hier beschriebenen Methoden die Virusproteine noch eindeutiger dargestellt werden können.

6. Zusammenfassung

Konzentrierungsmöglichkeiten für das Hepatitis A-Virus (HAV), das auf fötalen Affennierenzellen (Frhk-4/R) in vitro vermehrt worden war, konnten anhand zweier Verfahren demonstriert werden:
1. durch mehrmalige Ultrazentrifugationen,
2. durch Fällung der Proteine mit Ammoniumsulfat und nachfolgenden Ultrazentrifugationen.
Das konzentrierte HAV wurde durch Saccharose-Sedimentations- und CsCl-Gradienten-Zentrifugation gereinigt.
Die Gradienten wurden mit dem RIA auf Antigenität und parallel dazu auf Infektiosität austitriert. Die Peakfraktionen des gereinigten HAV wurden elektronenoptisch dargestellt und zusätzlich Sedimentationsverläufe und Gelelektrophoresen durchgeführt. Außerdem wurden die Proteine der Peakfraktionen nach Markierung mit ^{125}J im Autoradiogramm und durch Ausmessung der Gelstreifen im Gamma-Counter dargestellt und deren Molekulargewichte bestimmt.
Gereinigtes HAV/Frhk-4/R bandete in CsCl in 2 Peaks: bei 1,18 - 1,23g/cm^3 und 1,255 - 1,34g/cm^3.
Infektiosität wurde in beiden Peaks nachgewiesen, korrelierte jedoch hauptsächlich mit dem Peak höherer Dichte.
Molekulargewichtsbestimmungen der Proteine des auf menschlichen Fibroblasten (HFS) vermehrten HAV ergaben höhermolekulare Anteile zwischen 180kD und 70kD, sowie niedermolekulare Proteine mit 65kD-50kD, 41kD-38kD, 29kD-27kD und 17kD-16kD.
Die Sedimentationskonstanten der 1,19 - 1,22g/cm^3-, bzw. 1,22g/cm^3-HAV/HFS-Partikel wurden mit 76s, bzw. 82s und der 1,28 - 1,32g/cm^3-, bzw. 1,325g/cm^3-HAV/HFS-Partikel mit 150s, bzw. 144s bestimmt.
Nach der Infektiositätstitration der Fraktionen des

Sedimentationslaufs waren nur die 1,325g/cm^3 Partikel infektiös, während bei den 1,22g/cm^3 Partikel keine Infektiosität nachgewiesen werden konnte.

7. Literaturverzeichnis

1) ABB, CLAUS, DEINHARD, FLEHMIG, FRÖSNER, GERLICH, HÖPKEN, KOCH, M.A., MAASS, MEYER Z. BÜSCHENFELDE, MÜLLER, R., PÖHN, POHLE, SCHOBER, SPICHER, STEUER, STÜCK, THOMSSEN, WEISE, H.J., WEISE, W.: Virushepatitiden. Bundesgesundheitsblatt 22, 473-487 (1979).

2) BRADFORD, M.: A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976).

3) BRADLEY, D.W., HORNBECK, C.L., GRAVELLE, C.R., COOK, E.H., MAYNARD, J.E.: CsCl banding of hepatitis A-associated virus-like particles. J. Infect. Dis. 131, 304-305 (1975).

4) BRAKKE, M.K.: Density gradientzentrifugation: A new seperation technique. J. Amer. Chem. Soc. 73, 1847-1848 (1951).

5) COULEPIS, A.G., LOCARNINI, S.A., and GUST, I.D.: Iodination of hepatitis A virus reveals a fourth structural polypeptide. J. Virol. 35, 572-574 (1980).

6) COULEPIS, A.G., LOCARNINI, S.A., FERRIS, A.A., LEHMAN, N.I., and GUST, I.D.: The polypeptides of hepatitis A virus. Intervirol. 10, 24-31 (1978).

7) COULEPIS, A.G., TANNOCK, G.A., LOCARNINI, S.A., GUST, I.D.: Evidence that the genome of hepatitis A virus consists of singel-stranded RNA. J. Virol. 37, 473-477 (1981).

8) DAVIS, B.J.: Disc Electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 404-427 (1964).

9) DEINHARD, F., HOLMES, A.W., CAPPS, R.B., POPPER, R.: Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages and description of liver lesions. J. Exp. Med. 125, 673-688 (1967).

10) DIENSTAG, J.L., FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.Z., PURCELL, R.H., BOGGS, J.D., CONRAD, M.E.: Fecal shedding of hepatitis A-antigen. Lancet IV, 765-767 (1975).

11) DUVE, de, C., BERTHET, J., BEAUFAY, H.: Disc electrophoresis-I. Background and theory. Prog. Biophys. Biophys. Chem. 9, 325-369 (1959).

12) FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.Z. PURCELL, R.H.: Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. Science, 182, 1026-1028 (1973).

13) FEINSTONE, S.M., KAPIKIAN, A.Z., GERIN, J.L., PURCELL, R.H.: Bouyant density of the hepatitis A virus-like particle in cesium chloride. J. Virol. 13, 1412-1414 (1974).

14) FEINSTONE, S.M., MORITSUGU, Y., SHIH, J.W.-K., GERIN, J.L., PURCELL, R.H.: Characterization of HAV. In: Viral Hepatitis. A contemporary assessment of etiology, epidemiology, pathogenesis and prevention. S.44, The Franklin Institute Press, 1978.

15) FLEHMIG, B.: Laboratoriumsdiagnose der Hepatitis A-Infektionen. Bundesgesundheitsblatt 17, 277-283 (1978).

16) FLEHMIG, B.: Hepatitis A-virus in cell culture: I. Propagation of different hepatitis A-virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (Frhk-4). Med. Microbiol. Immunol. 168, 239-248 (1980).

17) FLEHMIG, B.: Hepatitis A virus in cell culture. II. Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4/R cells. Med. Microbiol. Immunol. 170, 73-81 (1981).

18) FLEHMIG, B., VALLBRACHT, A., WURSTER, G.: Hepatitis A virus in cell culture. III. Propagation of hepatitis A-virus in human embryo kidney cells and human embryo fibroblast strains. Med. Microbiol. Immunol. 170, 83-89 (1981).

19) FLEHMIG, B., FRANK, H., FRÖSNER, G.G., GERTH, H.-J.: Hepatitis A-virus particles in stools of patients from a natural hepatitis outbreak in Germany. Med. Microbiol. Immunol. 163, 209-214 (1977).

20) FLEHMIG, B., RANKE, M., BERTHOLD, H., GERTH, H.-J.: A solid-phase radioimmunoassay for detection of IgM antibodies to hepatitis A virus. J. Infect. Dis. 140, 169-175 (1979).

21) FLEHMIG, B., RANKE, M., FRANK, H., GERTH, H.J.: Application of a solid-phase radioimmunoassay and immune electron microscopy for hepatitis A in diagnosis and research. Med. Microbiol. Immunol. 166, 187-194 (1978).

22) FLEHMIG, B., VALLBRACHT, A., LUTHARDT, T. und GERTH? H.-J.: Ergebnisse aus der Hepatitis A-Diagnostik des Hygiene Instituts in Tübingen. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 252, 147-153 (1982).

23) FRAENKEL-CONRAT, H.: The properties of virus particles and the nature of viral infectivity. In: Chemistry and Biology of Viruses. S. 126-127, Academic Press, New York (1969).

24) FRÖSNER, G.G., DEINHARD, F., SCHEID, R., GAUSS-MÜLLER, V., HOLMES, N., MESSELBERGER, V., SIEGL, G., ALEXANDER, J.J.: Propagation of human hepatitis A-virus in a hepatoma cell line. Infect. 6, 303-306 (1979).

25) FRÖSNER, G., OVERBY, L.R., FLEHMIG, B., GERTH, H.-J., HAAS, H., DECKER, R.H., LING, Ch.-M., ZUCKERMAN, A.J. and FRÖSNER, G.G.: Seroepidemiological investigation of patients and family contacts in an epidemic of hepatitis A. J. Med. Virol. 1, 163-173 (1977).

26) GERLICH, W.H. and FRÖSNER, G.G.: Topology and immunoreactivity of capsid proteins in hepatitis A virus. Med. Microbiol. Immunol. 172, 101-106 (1983).

27) HOLLINGER, F.B., BRADLEY, D.W., MAYNARD, J.E. DREESMAN, G.R. and MELNICK, J.L.: Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay. J. Immunol. 115, 1464-1466 (1975).

28) JAWETZ, E., MELNICK, J.L., ADELBERG, E.A.: Berechnung des LD_{50}-Titers nach der Methode von Kärber. In: Med. Mikrobiologie, S. 466, Springer, Berlin, 1977.

29) LÄMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacterophage T4. Nature, 227, 680-685 (1970).

30) LUGTENBERG, B. MEIJERS, J., PETERS, R., HOEK, P.v. and ALPHEN, L.v.: Electrophoretic resolution of the "major outer membrane protein" of Escherichia Coli K12 into four bands. Febs Letters 58, 254-258 (1975).

31) MAPOLES, J.E., ANDEREGG, J.W., and RUECKERT, R.R.: Properties of poliovirus propagated in medium containing cesium chloride: Implications for picornaviral structure. Virol. 90, 103-111 (1978).

32) MESELSON, M., STAHL, F.W. and VINOGRAD, J.: Equilibrium sedimentation of macromolecules in density gradients. Proc. Nat. Acad. Sci. 43, 581-588 (1957).

33) MILLER, W.J., PROVOST, P.J., MCALEER, W.J., ITTENSOHN, O.L., VILLAREJOS, V.M. and HILLEMAN, M.R.: Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody. Application to diganostic and epidemiological investigations. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 254-261 (1975).

34) MORTIMER, P.P.: Hepatitis A and its virus. In: Recent Advances in Clinical Virology. S. 1-15, Churchill Livingstone, New York, 1980.

35) OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.R.: A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105, 361-363 (1980).

36) ORNSTEIN, L.: Disc Electrophoresis-I. Backgound and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 321-349 (1964).

37) PROVOST. P.J., HILLEMAN, M.R.: Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 213-221 (1979).

38) PROVOST, P.J., ITTENSOHN, O.L., VILLAREJOS, V.M., HILLEMAN, M.R.: A specific complement-fixation test for human hepatitis A employing CR 326 virus antigen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 962-969 (1975).

39) PROVOST, P.J., BANKER, F.S., GIESA, P.A., MC ALLEER, W.J., BUYNAK, E.B., and HILLEMAN, M.R.: Progress toward a live, attenuated human hepatitis A vaccine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 170, 8-14 (1982).

40) PROVOST, P.J., WOLANSKI, V.S., MILLER, W.J., ITTENSOHN, O.L., MCLEER, W.J., HILLEMAN, M.R.: Physical, chemical and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR 326. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 148, 532-539 (1975).

41) PURCELL, R.H., WONG, D.C., MORITSUGU, Y., DIENSTAG, J.L., ROUTENBERG, J.A., BOGGS, J.D.: A micro-titer solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. J. Immun. 116, 349-356 (1976).

42) PUTNAK, J.R. and PHILLIPS, B.A.: Picornaviral Structure and assembly. Microbiol. Rev. 45, 287-315 (1981).

43) SCHULMAN, A.N., DIENSTAG, J.L., JACKSON, D.R., HOOFNAGLE, J.H., GERETY, R.J., PURCELL, R.H., BARKER, L.F.: Hepatitis A antigen particles in liver, bile, and stool of chimpanzees. J. Infec. Dis. 134, 80-84 (1976).

44) SHAPIRO, A.L., VINUELA, E., MAIZEL, J.V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820 (1967).

45) SIEGL, G.: Structure and biology of hepatitis A virus.
In: Viral Hepatitis. Proc. Intern.Symp. New York, The Franklin Institute Press, Philadelphia, 1982.

46) SIEGL, G., FRÖSNER, G.G.: Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. I. Size, density and sedimentation.
J. Virol. 26, 40-47 (1978).

47) SIEGL, G., FRÖSNER, G.G.: Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. II. Type and configuration of nucleic acid.
J. Virol. 26, 48-53 (1978).

48) SU, R.T. and TAYLOR, M.W.: Morphogenesis of picornaviruses: Characterization and assembly of bovine enterovirus subviral particles.
J. Gen. Virol. 30, 317-328 (1976).

49) SWITZER, R.C., MERRIL, C.R., and SHIFRIN, S.: A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels.
Anal. Biochem. 98, 231-237 (1979).

50) TRATSCHIN, J.D., SIEGL, G., FRÖSNER, G.G. and DEINHARD, F.: Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. III. Structural proteins.
J. Virol. 38, 151-156 (1981).

51) WEBER, K., OSBORN, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224, 4406-4412 (1969).

Herrn Priv.-Doz. Dr. Flehmig danke ich für die Überlassung des Themas, für die großzügige Unterstützung und für viele wertvolle Hinweise und Diskussionen.

Besonders danken möchte ich auch Frau J. Hentschel für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, sowie Herrn K.-H. Müller für die Anleitung und Anregungen zur Durchführung der Gelelektrophorese.
Herrn Dr. Strohmeier danke ich für die Überlassung des Haemocyanins.
Im übrigen möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Virologie des Hygiene Instituts Tübingen, insbesondere Frau Dr. Döller und Frau M. Pfisterer für Diskussionsbereitschaft und wertvolle Hilfestellung danken.

Lebenslauf

Am 30.12.1953 wurde ich, Ursula Claudia Heinricy, als Tochter von Otto Heinricy und seiner Ehefrau Traude, geb. Kramer, in Ottendorf, Kreis Schwäbisch Hall geboren. Von 1960 bis 1964 besuchte ich die Volksschule in Leinfelden/Filder und anschließend die Realschule. Durch den Umzug meiner Eltern nach Stuttgart-Freiberg wechselte ich 1966 in die Rilke-Realschule in Stuttgart-Rot über und legte dort 1969 die Mittlere Reife ab.

Die Ausbildung als pharmazeutisch-technische Assistentin begann ich im Frühjahr 1970 in der Kerschensteinerschule in Stuttgart-Feuerbach und legte dort im Frühjahr 1972 die theoretische Abschlußprüfung ab. In der Eichendorff-Apotheke in Stuttgart-Rot leistete ich mein halbjähriges Praktikum und beendete dann im Herbst 1972 meine Ausbildung mit der praktischen Abschlußprüfung. Bis 1974 arbeitete ich in der Osterholz-Apotheke in Ludwigsburg. 1974 bis 1977 war ich im Max-Planck-Institut, Abteilung Virusforschung in Tübingen beschäftigt.

Ab 1975 besuchte ich das Abendgymnasium in Reutlingen und im Frühjahr 1978 legte ich dort das Abitur ab.

Im Wintersemester 1978 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Universität Ulm. Im Sommersemester 1980 wechselte ich an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen, legte dort im August 1980 das Physikum und im August 1981 das 1. Staatsexamen ab.

Danach begann ich mit der Anfertigung meiner Dissertation unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. Flehmig am Hygiene Institut Tübingen und schloß dieselbe 1983 ab. Nach dem 2. Staatsexamen im Frühjahr 1984 leistete ich das praktische Jahr in Tübingen ab und beendete das Studium der Humanmedizin mit dem 3. Staatsexamen am 30.4.1985.

Druck Köhler Tübingen